ZUR WIRKUNG VON D_2O AUF BIOCHEMISCHE PARAMETER VON NORMAL- UND TUMORZELLEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
im Fachbereich Pharmazie
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Gerd Biesewig
aus Hamburg

Berlin 1974

1975

ZUR WIRKUNG VON D_2O AUF BIOCHEMISCHE PARAMETER VON NORMAL- UND TUMORZELLEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
im Fachbereich Pharmazie
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Gerd Biesewig
aus Hamburg

Berlin 1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Gutachter: Prof.Dr. M. Wenzel

2. Gutachter: Prof.Dr. K.-H. Frömming

Tag der mündlichen Prüfung: 15. April 1975

Druck: Der Präsident der Freien Universität Berlin – Zentrale Universitätsdruckerei V aA 4, 1 Berlin 41

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde in der Radioisotopen-Abteilung des Instituts für Pharmazie der Freien Universität Berlin unter Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Wenzel durchgeführt.

Für die wertvolle und großzügige Förderung dieser Arbeit möchte ich hiermit

Herrn Prof. Dr. M. Wenzel

herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. H.-J. Merker

für die jederzeit gewährte freundliche Hilfe bei der Durchführung und Interpretation der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATUR-ÜBERSICHT	3
- Theoretische Grundlagen (Deuteriumoxid)	3
- Isotopieeffekte in der Biologie und Biochemie	9
- Enzyme: Theoretische Grundlagen	13
3. ERGEBNISSE	18
3.1. Der Einfluß von D_2O auf Enzyme (Lactat-DH)	18
3.1.1. Der Einfluß von Deuteriumoxid bei der Hitzeinaktivierung von Lactat-Dehydrogenase	18
3.1.2. Der Einfluß von Deuteriumoxid bei der Harnstoff-Denaturierung von LDH	33
3.2. Der Einfluß von D_2O auf Zellen und Gewebe	41
3.2.1. Theoretische Vorbemerkungen: Prinzipien der Methodik	41
- Literatur zur Wirkung von D_2O auf Zellen	44
- Literatur zur Hyperthermie	46
3.2.2. Der Einfluß von Hyperthermie und D_2O auf Normalgewebe (Leber, Maus)	48
3.2.3. Der Einfluß von D_2O auf Tumorzellen (Ehrlich Ascites-Tumor)	53
A) Der Einfluß der Temperatur (Hyperthermie)	
a) Beeinflussung der DNA-Synthese	53
b) Beeinflussung des ATP-Spiegels	74
c) Beeinflussung der aeroben Glykolyse	82
d) Beeinflussung der Membranpermeabilität (Nigrosin-Färbung)	93
e) Elektronenmikroskopische Befunde nach Hyperthermie von Ascites-Tumorzellen	96

B) Der Einfluß anderer denaturierender Faktoren am Beispiel alkylierender Substanz (TRENIMON) 112

4. ZUSAMMENFASSUNG 117

5. MATERIAL UND METHODEN 121

6. LITERATUR-REGISTER

A) Spezielle Literatur zum Text 145

B) Weitere Literatur: Biologische Wirkungen von D_2O 159

1. EINLEITUNG

Deuterium wurde 1932 von UREY durch Spektralanalyse entdeckt (1). Schon kurz danach wurde auch die Bedeutung des Deuteriums für biologische Systeme erkannt:
Man stellte fest, daß Veränderungen in den chemischen Reaktionsraten, die durch den Austausch von Wasserstoff durch Deuterium bedingt sind, starke Effekte bei lebenden Organismen hervorrufen.

In der Folgezeit erschienen zahlreiche Artikel über den Einfluß von Deuteriumoxid auf Pflanzen und niedere Organismen (siehe auch Literaturteil B), aus denen die Annahme formuliert wurde, daß diese Organismen gegenüber einer Substitution von H durch D im Medium stark empfindlich seien. Man schloß daraus, daß Schweres Wasser viele Lebensprozesse stark abbremst und daß eine Zellteilung oft schon bei einer weit von 100% entfernten Substitution von H durch D unmöglich ist. In der letzten Zeit mußten diese Vorstellungen jedoch teilweise stark korrigiert werden.

Im allgemeinen hat der Deuterium-Isotopeneffekt eine Reduzierung der Reaktionsraten zur Folge, was durch den Unterschied der thermodynamischen und kinetischen Eigenschaften zwischen beiden Isotopen hervorgerufen wird. Bedingt durch die größere Stabilität der Deuterium-Bindungen, ist die Abspaltungsrate von D-Atomen im allgemeinen viel langsamer als die der entsprechenden H-Atome.

Die Wasserstoffbindungen der biologisch wichtigen Makromoleküle werden ca. 10mal schneller aufgespalten, als die der entsprechenden Deuterium-Bindungen.

LEWIN (2, 3) und KATZ, CRESPI et al. (4, 5) stellten fest, daß die sog. "Schmelztemperatur" von Biopolymeren sich nach Deuterierung (durch D_2O als Lösungsmittel) um einige ^{o}C erhöht.

Andererseits deuteten verschiedene Veröffentlichungen (6 - 11) auf die Möglichkeit hin, Wirkstofflösungen durch Verwendung von Deuteriumoxid zu "stabilisieren".

Uns interessierte nun die Frage, ob es auch möglich sei, Zellgewebe oder Organe durch Behandlung mit Deuteriumoxid gegen schädigende Einflüsse zu schützen.

Dabei sollten folgende Probleme geklärt werden:

1) Lassen sich Zellen bzw. Gewebe in Deuteriumoxid gegen denaturierende Einflüsse schützen?

2) Wirkt D_2O toxisch auf Zellen?

3) Wie wirkt sich insbesondere HYPERTHERMIE auf Zellen und Gewebe aus, die statt in Wasser in Deuteriumoxid gehalten werden?

2. LITERATUR - ÜBERSICHT

Theoretische Grundlagen

Die Änderung der isotopen Zusammensetzung der Stoffe ruft Veränderungen ihrer physikalischen bzw. physikalisch-chemischen Eigenschaften Eigenschaften hervor, die man gewöhnlich als I s o t o p i e e f f e k t e bezeichnet.

> Nach der heutigen Definition sind Isotope Nuklide, die verschiedene Neutronenzahl, aber gleiche Protonenzahl besitzen und damit demselben chemischen Element angehören.

Diese Isotopieeffekte sind relativ groß bei den Wasserstoff-Isotopen, wesentlich kleiner dagegen bei den Isotopen der anderen Elemente. Durch den großen Massenunterschied der Wasserstoff-Isotope findet man besonders deutliche Unterschiede in den Reaktionsgeschwindigkeiten und Gleichgewichtskonstanten. So ist z.B. das Ionenprodukt von "Schwerem Wasser" (D_2O) bei 25°C nur $0{,}2 \cdot 10^{-14}$, also 5mal kleiner als das Ionenprodukt von Wasser.
Die Möglichkeit, Wasserstoff in Verbindungen gegen Deuterium oder Tritium auszutauschen, ist von besonderem Interesse, weil sie Aufschluß geben kann über Bindungsfestigkeiten von H-Atomen, besonders über deren Abspaltbarkeit als Protonen, wie über Molekülstrukturen und Reaktionsmechanismen.
Ein neueres interessantes Anwendungsgebiet ist die Nutzung von Isotopieeffekten zur Stabilisierung von Chemikalien, Arzneimitteln oder Veredelung von Gebrauchsgütern (6 - 12).

Physikalische Eigenschaften

Isotopieeffekte äußern sich, wie schon erwähnt, in vielfältiger Weise. Am Beispiel des Deuteriumoxids im Vergleich zu natürlichem Wasser (Anm.: natürliches Wasser ist nicht reines $H_2{}^{16}O$, sondern enthält kleine Mengen schwerer Isotope, siehe 13-15) lassen sich die

Physikalische Eigenschaften von D_2O und H_2O

	D_2O	H_2O
Molekulargewicht	20,02823	18,01558
Bildungswärme des fl.Wassers aus den Elementen bei 1 at, 25°C (in Kcal/Mol)	70,414	68,317
Gefrierpunkt (1 at) in °C	3,813	0,00
Schmelzwärme (1 at) in Kcal/Mol	1,501	1,436
Siedepunkt (1 at) in °C	101,43	100,00
Verdampfungswärme (25°C, 1 at) in Kcal/Mol	10,850	10,519
Dampfdruck in Torr bei 20°C	15,24	17,54
bei 100°C	721,6	760,0
Kritische Temperatur (in °C)	371,5	374,2
Kritischer Druck (in at)	218,6	218,53
Molwärme (in cal/Mol·Grad), 25°C	20,25	18,17
Temp.der max.Dichte (1 at) in °C	11,23	3,98
Dichte (20°C) in g/ml (d_4^{20})	1,10536	0,998232
Viskosität (20°C) in Millipoise	12,60	10,05
Oberflächenspannung (20°C) in dyn/cm	72,12	72,75
Dipolmoment (25°C)	$1,87 \cdot 10^{18}$	$1,86 \cdot 10^{18}$
Brechungsindex (25°C), Na-Linie	1,32796	1,33250
Dielektrizitätskonstante (25°C)	78,54	78,25
Löslichkeit von NaCl bei 25°C (g Salz/ 100 g Wasser)	30,56	35,92
Ionenbeweglichkeit in wäßriger Lösung (25°C)		
H_3O^+		349,8
D_3O^+	250,1	
Elektrische Leitfähigkeit einer 0,01n KCl-Lösung (25°C) in $\Omega^{-1} \cdot cm^2$	117	141,3
Ionenprodukt (25°C)	$1,95 \cdot 10^{-15}$	$1,008 \cdot 10^{-14}$

TABELLE 1 (aus 29)

physikalisch-chemischen Unterschiede leicht zeigen (TABELLE 1).

Einige physikalische Eigenschaften ändern sich beim Übergang von H_2O zu D_2O nur wenig, nämlich diejenigen, die weniger von der Masse und der Nullpunktsenergie, als von der Struktur abhängig sind.

Für unsere folgenden Untersuchungen sind jedoch einige Unterschiede wichtig:

Die Löslichkeit von Salzen in Schwerem Wasser ist bedeutend geringer als in gewöhnlichem Wasser, der Unterschied wird jedoch mit steigender Temperatur geringer. In verdünnten Lösungen besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Elektrolytlöslichkeit und Deuteriumgehalt.

Für viele Elektrolyte gilt, daß die Ionenbeweglichkeiten und damit die elektrischen Leitfähigkeiten in D_2O um etwa 20% geringer sind als in H_2O. Der durch die WALDENsche Regel gegebene Zusammenhang mit der Viskosität des Lösungsmittels wird damit bestätigt. Auf Lösungen von Säuren und Basen in H_2O bzw. D_2O ist die Regel jedoch nicht anwendbar, da beim Übergang von H_2O zu D_2O nicht nur die isotope Zusammensetzung des Lösungsmittels, sondern auch die des gelösten Elektrolyten verändert wird.

Schweres Wasser zeigt eine erheblich geringere Eigendissoziation als normales Wasser:

$$\left[H_3O^+\right] \cdot \left[OH^-\right] = 1{,}01 \cdot 10^{-14}$$

$$\left[D_3O^+\right] \cdot \left[OD^-\right] = 0{,}195 \cdot 10^{-14}$$

Deuteriumoxid ist daher ein schwächerer Elektrolyt als Wasser.

Die Dissoziationskonstanten von OH-, NH-, CH- und SH-Säuren sind damit ebenfalls in D_2O kleiner als in H_2O, d.h. ihre Säurestärke ist geringer.

Der Neutralpunkt der pH-Wert-Skala (pH = 7,0) entspricht demzufolge pD = 7,44 in der pD-Wert-Skala (24).

Ausführliche Literatur über physikalisch-chemische Eigenschaften von D_2O und über die damit verbundenen Isotopieeffekte siehe unter 13 - 40.

Der Austausch der Wasserstoff-Isotope

Im Jahre 1933 entdeckten LEWIS (41), BONHOEFFER und BRAUN (42) einen schnellen Isotopenaustausch des Protiums mit dem Deuterium des Schweren Wassers in Lösungen von Ammoniak, Ammoniumsalzen und Zuckern (25, 43, 44).
Schon bei den ersten Untersuchungen fand man, daß die Geschwindigkeit dieses H - D - Austausches von der Art seiner Bindung abhängig ist:

In Bindungen mit Halogenen, Sauerstoff, Schwefel, Stickstoff u.a. geht der Isotopenaustausch größtenteils leicht und in vielen Verbindungen praktisch augenblicklich vor sich. Im Gegensatz dazu findet ein Austausch in Bindungen mit Kohlenstoff normalerweise nicht statt. Er geht nur unter besonderen Bedingungen oder bei einer besonders günstigen Molekülstruktur vor sich.

Zusammenfassende Darstellungen dieser Austauschreaktionen finden sich u.a. bei POLANYI (44), UREY (45), sowie SELWOOD (46).

Auf die vielfach recht komplizierten Reaktionsmechanismen kann hier nicht weiter eingegangen werden, doch werden in der Literatur zwei Austauschmechanismen an Beispielen diskutiert (47 - 49):

1) Der Austausch über die Ionen, bei dem ein Zusammenhang zwischen Geschwindigkeit und Dissoziationskonstanten zu erwarten ist.

2) Der Austausch über Wasserstoffbrücken.

Aus TABELLE 2 ist leicht zu ersehen, daß eine C-H-Bindung etwa 7mal schneller gespalten wird, als eine C-D-Bindung, eine N-H-Bindung 8,5mal schneller und eine O-H-Bindung etwa 10mal schneller als die korrespondierende D-Bindung.
Dieser Isotopieeffekt nimmt mit zunehmender Temperatur ab.

Max.kinetische Isotopieeffekte für die Spaltung von Wasserstoffbindungen:

Bindung	$E_o (=E_{max})$ cal/Mol	$(k_H/k_D)_{max}$ 0°C	25°C	100°C
C - H	1150	8,3	6,9	4,7
N - H	1270	10,3	8,5	5,5
O - H	1400	12,6	10,6	6,6

TABELLE 2

Beim Arbeiten mit Deuteriumoxid unterscheidet man hauptsächlich 3 Arten von Lösungsmittel-Isotopieeffekten:

1) Als primären reaktionskinetischen Lösungsmittel-Isotopieeffekt bzeichnet man das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten K_H / K_D für den Übergang eines Wasserstoffions aus einer Bindungsbeziehung im Wasser zu einer Bindungsbeziehung im gelösten Substrat (oder in umgekehrter Richtung).
Bei Mehrstufen-Reaktionen läßt sich natürlich nur dann ein Effekt feststellen, wenn die Bindung des Isotops im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt gelöst wird.

2) Als sekundären reaktionskinetischen Lösungsmittel-Isotopieeffekt bezeichnet man die auf Grund der unterschiedlichen isotopen Zusammensetzung des Lösungsmittels hervorgerufenen Änderungen der Reaktionsgeschwindigkeit durch Wasserstoffionen, die keinem Wechsel ihrer Bindungsbeziehung unterliegen.

   Sie können als Substituenteneffekte verstanden werden, wonach einer C-D-Bindung ein stärkerer +I-Effekt zukommt als einer C-H-Bindung (40, 50-54) und einer CD_3-Gruppe eine schwächere Hyperkonjugation als einer CH_3-Gruppe (55).
   Weiter können sekundäre Wasserstoff-Isotopeneffekte durch die geringere Raumerfüllung von Deuterium (56) bzw. durch geringere Schwingungsamplituden von D im Vergleich zu H erklärt werden (57).

3) Als thermodynamischer Lösungsmittel-Isotopieeffekt wird die durch eine isotope Modifikation des Lösungsmittels verursachte Änderung der Gleichgewichtskonstante gelöster Elektrolyte bezeichnet.

Isotopieeffekte in der Biologie und Biochemie

In biologischen Systemen lassen sich als Folge der schon erwähnten Gleichgewichts-, kinetischen und Lösungsmittel-Isotopieeffekte noch weitere Einflüsse beobachten, z.B. veränderte Permeabilität, morphologische und genetische Änderungen, veränderte Wachstumsraten usw. Auch hier rufen die Wasserstoffisotope die stärksten Veränderungen hervor.
Für das Verständnis dieser physiologischen Isotopieeffekte sind die bereits genannten Mechanismen und Gesetzmäßigkeiten sicher nicht ausreichend. Trotzdem lassen sich viele einfache enzymatische Einzelprozesse oft auf primäre oder sekundäre Isotopieeffekte durch den Einfluß von Deuteriumoxid auf Substrate bzw. Enzyme zurückführen (58-61).

Seit der Entdeckung des Deuteriums wurde eine Reihe von Artikeln veröffentlicht, die sich mit dem Einfluß von D_2O auf bestimmte niedere Organismen, Algen und höhere Pflanzen befassen (siehe 62-64, Literatur-Teil B).

Während man früher annahm, daß der völlige Ersatz von Wasserstoff durch Deuterium mit Leben nicht vereinbar sei, zeigten besonders intensive Untersuchungen von KATZ und Mitarbeitern, daß viele einzellige Wassergewächse und Bakterien unter bestimmten Umständen in der Lage sind, sich bei praktisch vollständiger Substitution von H_2O durch D_2O fortzupflanzen (65-70).

GROSS und SPINDEL führten interessante Untersuchungen über den Einfluß von D_2O auf die Mitose von Zellen durch (71,72). Sie untersuchten den Einfluß von D_2O auf die Teilung einer Meeresigelart und einer Ringelwurmart und stellten dabei fest, daß D_2O ein A n t i m i t o s e m i t t e l ist, das ein beliebiges Stadium der Mitose reversibel "einfriert" und unmittelbar auf das Mitosesystem der Zelle wirkt. Sie erklärten dies Phänomen mit einer Veränderung der Festigkeit der Wasserstoffbindungen, die in der Struktur der Desoxy-

ribonucleinsäure (DNA) vorhanden sind.
(siehe auch die Einwände von BOREK, RITTENBERG 78,79).

Untersuchungen von BRAY, THOMSON und anderen (105-107) wiesen darauf hin, daß die Hemmmung der DNA-Synthese durch Deuteriumoxid in vivo als auch in vitro ein eindeutig meßbarer Effekt ist.

Die Tatsache, daß die meisten biologischen Effekte von D_2O in Geweben mit hoher mitotischer Aktivität festgestellt werden, läßt darauf schließen, daß die DNA-Synthese den auf D_2O am empfindlichsten reagierenden Schritt darstellt.

DICKEN (106,107) folgert daraus, daß der Informationsfluß von der DNA zur RNA wie zur neugebildeten DNA durch Deuterierung gehemmt wird. Außerdem lassen die feinen Unterschiede in den Profilen hitzedenaturierter DNA deuterisierter Tiere darauf schließen, daß die Substitution von Deuterium in austauschbare Stellungen (bzw. schwer austauschbare Stellungen) der DNA-Moleküle die Sekundärstruktur verändert hat. Solche DNA von D_2O-behandelten Tieren erscheint im Vergleich mit DNA-Präparationen normaler Tiere leicht denaturiert (106,107).

Von einigem Interesse schienen Untersuchungen von KATZ et al. zu sein, der eine größere Überlebensdauer von deuterierten, röntgenbestrahlten CF-1-Mäusen festgestellt hatte (92).
Nachdem sich somit frühere Vermutungen dieser Art durch GORDON, HART u.a. (93,94) bestätigt hatten, prüfte nun LOHMANN, ob sich Unterschiede auch auf molekularem Gebiet ergeben würden. Er untersuchte dabei die Strahlenempfindlichkeit des Enzyms Katalase und stellte einen Schutzeffekt von D_2O fest (11).

Es ist ersichtlich, daß physiologische Prozesse, in denen Isotopenaustauschreaktionen stattfinden, zu komplex sind, um eindeutige physikalisch-chemische Rückschlüsse daraus ziehen zu können. Deshalb trachtete man danach, Theorien über den H-D-Austausch in Modellen mit synthetischen Makromolekülen oder genau bekannten Proteinen zu entwickeln.

Diese Methode wurde schon recht früh von HVIDT, LINDERSTRØM-LANG u.a. zur Aufklärung der Konformation von Proteinen verwendet (81-88).

TOMITA, RICH, DE LOZE und BLOUT fanden z.B. eine Verringerung der Stabilität der α-Helix von Makromolekülen als Folge der Deuterierung der Wasserstoffbindungen bzw. Wasserstoff enthaltenden Seitengruppen, aus der sich Änderungen der geometrischen Konfiguration dieser Moleküle ergaben (89).

Den Einfluß von Deuterium auf die Stabilität einer Polypeptidkette untersuchten auch CALVIN, HERMANS und SCHERAGA (76). Nachdem frühere Versuche, in denen Mäuse D_2O als Trinkwasser erhalten hatten, zu der Annahme geführt hatten, die Substitution von H durch D vermindere die Festigkeit der Wasserstoffbindungen und damit die Stabilität der Helix, wurde nun mit Poly-γ-benzyl-L-glutamat gefunden, daß Deuterierung die Stabilität der Helix erhöht. Die Umwandlungstemperatur (Erklärung im folgenden Kap.) liegt für das deuterierte Polypeptid um $11^{\circ}C$ tiefer als für die protonierte Verbindung.

Dieses Verhalten wird so erklärt, daß Dichloressigsäure-Moleküle durch Wasserstoffbrücken an das Peptid gebunden den geknäuelten Zustand stabilisieren, und daß die Festigkeit dieser Wasserstoffbrücken-Bindungen durch Deuterierung stärker herabgesetzt wird, als die Festigkeit der intramolekularen Wasserstoffbrücken, welche die Helix-Konfiguration aufrechterhalten.

Ähnliche Untersuchungen führte S.LEWIN durch, der ebenfalls die Bindung von D_2O an Helixstrukturen in Nucleinsäuren bestimmte. Da die Schmelztemperaturen von DNA aus Lachssperma in D_2O wesentlich höher liegen als in Wasser, sind nach seinen Ausführungen die Helix-Strukturen in Schwerem Wasser stabiler, was auf die Ausbildung von Deuteriumbrücken zurückzuführen ist (2,3)/siehe dazu auch 4,90!)

Die Hitzestabilität von Proteinen und Polypeptiden in Lösungen nimmt bei Ersatz normalen Wassers durch Schweres Wasser zu:

Dies konnte von verschiedenen Forschern nachgewiesen werden.

Daher erfolgen die durch Wärme hervorgerufene Umwandlung der Helix in das statistische Knäuel (74), der irreversible Verlust der Elastizität des Keratins des Rattenschwanzes (96) und der Schmelzpunkt der Gelatine (97) in Deuteriumoxid bei Temperaturen um ca. 4°C höher als in Wasser.

DESCHTCHEREVSKI konnte nun zeigen, daß auch die Hitzestabilität des Skelettmuskels des Frosches in D_2O um 5 - 6°C zunimmt. Dabei erhöhte sich die Wärmeresistenz des Muskels mit steigender D_2O-Konzentration (98).

Die verschiedenen thermostabilisierenden Wirkungen von D_2O auf native und glycerinisierte Schneidermuskeln des Frosches werden in weiteren Experimenten aus der Erhöhung der Stabilität der thermoempfindlichen Membransysteme der Muskelfaser erklärt (99,100).

In der Zwischenzeit sind verschiedene Veröffentlichungen erschienen, in denen über die Stabilisierung von Pflanzen- und Tierzellen sowie Proteinen gegenüber Hitze und hydrostatischem Druck in D_2O berichtet wurde (101-104).

In allen Fällen wurden nahezu die gleichen Werte gefunden, offenbar zusammenhängend mit der Festigung der Struktur der Protein-Moleküle.

ENZYME

Wie schon erwähnt lassen sich Einflüsse von D_2O leichter an einfachen Strukturen als an komplizierten biologischen Systemen untersuchen. Wir wählten dazu ein Enzym: Lactat-Dehydrogenase. Es scheint jedoch hier erforderlich, einige theoretische Überlegungen vorauszuschicken:

Theoretische Grundlagen

Ein Enzym kann bildlich als ein Stück geknäueltes Seil aufgefaßt werden, das im Raum durch eine Zahl von Querverbindungen stabilisiert wird. Für die Stabilisierung der nativen Konformation von Proteinmolekülen sind kovalente Bindungen und Nebenvalenzbindungen verantwortlich. Sie vermindern die Flexibilität der Polypeptidketten und bewirken, daß diese in geordneter, kompakter Form (HELIX) und nicht als statistisches Knäuel (RANDOM COIL) vorliegen (73-75, 108).

Als Nebenvalenzbindungen kommen in Frage:

1) Wasserstoffbrücken
2) hydrophobe Bindungen
3) ionische Bindungen

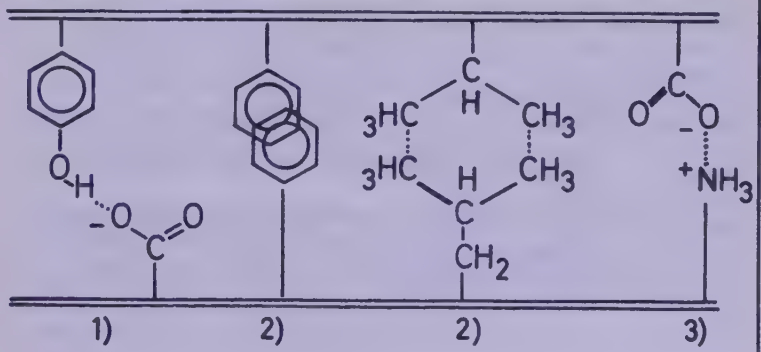


ABBILDUNG 1 (Beispiel für Nebenvalenzbindungen, s. 103)

Für die kovalenten Bindungen sind Peptidbindungen (-CO-NH-) sowie Disulfidbindungen verantwortlich, die durch Wasserstoffabspaltung aus den SH-Gruppen zweier Cysteinreste entstehen. Wasserstoffbrücken können sich zwischen verschiedenen Peptidbindungen ausbilden, aber auch polare Seitenketten können daran beteiligt sein (109). Nach heutiger Ansicht wird jedoch der hydrophoben Bindung die größte Bedeutung bei der Proteinstabilisierung zugeschrieben.
Nach KAUZMANN (108) sind Proteine besonders stabil, die möglichst viele apolare Gruppen in gegenseitigen Kontakt bringen und somit der wäßrigen Phase entziehen (siehe auch 117).

In der Struktur der Proteine unterscheidet man zwei extreme Zustände:

den biologisch aktiven (nativen), strukturell geordneten

und

den mit Verlust der biologischen Spezifität verbundenen (denaturierten), ungeordneten Zustand.

Diese beiden Zustände lassen sich mit dem α-Helix-Modell bzw. mit dem ungeordneten Knäuel-Zustand charakterisieren.

Betrachtet man z.B. ein Polypeptid in wäßrigem Medium, welches bei tiefer Temperatur als Helix vorliegt, so geht bei Temperaturerhöhung im System die Helix innerhalb eines relativ engen Temperaturintervalls in das statistische Knäuel über.
Diese Phasenumwandlung hat mit dem Schmelzprozeß eines Kristalls gemeinsam, daß sie reversibel ist. Erniedrigt man nämlich wieder die Temperatur des Systems, so kehrt das statistische Knäuel von selbst in die Helixform zurück.
Hierbei werden die Wasserstoffbrückenbindungen wieder zwischen den CO- und NH- Bindungen geschlossen und das System nimmt den unter diesen Bedingungen günstigsten thermodynamischen Zustand ein.

Untersuchungen von CALVIN und Mitarbeitern (76) haben gezeigt, daß der Ersatz der Wasserstoffatome durch Deuterium mit Änderungen der Bindungsstärke der Wasserstoffbindungen in der α-Helix von Makromolekülen verbunden ist (77).

Da die dreidimensionale Struktur der meisten Makromoleküle der Zelle, so der Proteine und Nucleinsäuren, von der Stärke der Wasserstoffbindungen abhängig ist, muß sich die Isotopensubstitution auf die geometrische Konfiguration dieser Moleküle auswirken.

Meistens stellt man den Übergang beider Zustände durch Messung physikalisch-chemischer Parameter fest, z.B. durch Bestimmung der Änderung der spezifischen Drehung, die infolge von Temperaturerhöhung auftritt (CALVIN, SCHERAGA 74,76).
Der Übergang läßt sich aber auch spektrophotometrisch verfolgen (FOSS 111).

Aus den von HERMANS und SCHERAGA gemachten Messungen an Ribonuclease geht hervor, daß der Vorgang der Phasenänderung als Funktion der Temperatur auch vom pK-Wert der Lösung abhängt. Dies gilt insbesondere bei Proteinen, bei denen die stabilisierende Wirkung von Disulfidbrücken nicht zur Wirkung gelangt und wo schon allein der Einfluß der pH-Änderung eine starke Volumenvergrößerung zur Folge hat.

Diese Volumenvergrößerung tritt jedoch auch beim Erwärmen bei Temperaturen über 40°C auf (WEBER 112), sie verläuft parallel mit der Auflockerung der Enzymstruktur und damit mit der (zunächst) reversiblen Verminderung des kompakten Zustandes.

Thermodynamische Überlegungen sind in der Literatur ausführlich dargelegt (138,139).

Wichtig für unsere folgenden Untersuchungen ist das von SCHERAGA und LASKOWSKI entwickelte Modell (113):

Während der "Denaturierung" spielt sich ein "Aktivierungsvorgang" ab, der von der Aufspaltung einer kritischen Zahl von Wasserstoffbindungen der Seitenkette abhängt.

Dies bedeutet die wichtigste Bedingung zur Umlagerung der Formen

Nativ ⟷ Aktiviert

Der Zerfall der Spiralstruktur (das "In-Unordnung-Geraten") der Proteine läßt sich mittels folgender Einwirkungen erreichen:

1. Durch Temperaturen über 50°C
2. Durch stark solvatisierende und wasserstoffbindende Substanzen in hoher Konzentration (Harnstoff, Guanidin)
3. Durch Detergenzienanionen in niedriger Konzentration
4. Durch Titration auf niedriges oder hohes pH
5. Durch sehr hohen hydrostatischen Druck (über 5000 atm)
6. Durch UV-Strahlung oder verschiedene Arten ionisierender Strahlung (Kathodenstrahlen, α-Teilchen).

Bei der Mehrzahl der Enzyme gehen Hemmung der Aktivität und z.B. Rotationsveränderung nicht überein, weil die Hemmung der Enzyme häufig eine lokale, wenige Seitenketten betreffende Wirkung bedeutet, wodurch die Kette insgesamt unbeeinflußt bleibt (114,115).

Einen interessanten Zusammenhang beobachteten KUSHNER und FRENKEL (110) zwischen dem Temperaturoptimum des Phasenüberganges und der Enzymwirkung:
Sie stellten nämlich die maximale Aktivität in dem Temperaturbereich (ca. 45°C) fest, in dem der Phasenübergang schon begonnen hatte, wo also die Struktur im Vergleich zur "nativen" Form schon etwas lockerer war.

H - D- Austausch

LENORMANT und BLOUT stellten 1953 an Hand infrarot-spektroskopischer Untersuchungen fest, daß die Amid-Wasserstoffe verschiedener Proteine in alkalischem Medium oder durch Erwärmen gegen Deuterium-Atome ausgetauscht werden (85,86,109,116).

Während in der nativen Polypeptid-Kette (Helix) innerhalb kurzer Zeit höchstens ein geringer Teil der labilen H-Atome (OH-, NH-, SH-Bindungen) ausgetauscht wird, tauschen die einfachen Peptide und die ungeordneten (denaturierten) Proteine bei Raumtemperatur ihre labilen H-Atome schnell gegen Deuterium aus. Der restliche Teil des Wasserstoffs benötigt für den gesamten Austausch häufig mehrere Tage.

Durch den denaturierenden Einfluß von Lauge, Harnstoff, Detergenzien usw. wird diese Zeit vermindert, d.h. die Austauschrate ist erhöht (LINDERSTRØM-LANG 81).

Bei Anwesenheit von D_2O hängt also die Austauschgeschwindigkeit u.a. davon ab, ob sich der Wasserstoff in freiem Zustand befindet oder in Form der Wasserstoffbindung. Ist die Austauschgeschwindigkeit langsam, so kann man daraus schließen, daß die H-Atome an irgendeiner Bindung beteiligt sind und somit ein bestimmter Teil des Proteins in Form der Helix vorliegen wird.

Stellt man sich in dem Wesen der "Denaturierung" also einen langsamen Phasenübergang von der teilweise vorkommenden Helixstruktur über viele mögliche Zwischenstufen bis zur völlig ungeordneten Knäuel-Struktur vor, so ist es einleuchtend, daß je nach der Stärke der Denaturierungsmittel eine mehr oder weniger große Änderung der Struktur der Proteine bis hin zum irreversiblen Verlust ihrer Spezifität erfolgt.

Wir entschieden uns daher entgegen der meist verwendeten Methoden zur Bestimmung der Denaturierung von Enzymen (Messung der physikalischen Parameter/ 115,118,119) für die Messung der Enzymaktivität nach Schädigung.

Weitere Literatur im Zusammenhang mit der Stabilisierung helikaler Strukturen unter 118 - 122. Eine Übersicht und Grundlagen zum Verständnis des H-D-Austausches gibt KLOTZ (91).(s.a. 83 !)

3. ERGEBNISSE

3.1.1. Einfluß von D_2O auf die Hitzeinaktivierung von LDH

Mehrere Autoren berichten über die Möglichkeit, Substanzen gegen Hitzedenaturierung bzw. -schädigung zu stabilisieren, wenn sie in Deuteriumoxid gelöst sind (6-10).
Wir verwendeten für unsere Untersuchungen als einfaches Modell das Enzym Lactatdehydrogenase (EC 1.1.1.27).

Uns interessierten folgende Fragen:

1) Schützt D_2O auch Enzyme gegen Hitzeinaktivierung?
2) Welche Konzentration ist dazu erforderlich?
3) Gibt es evt. eine Möglichkeit, Enzyme mit D_2O auch gegen andere denaturierende Einflüsse zu schützen ?

Einfluß der D_2O-Konzentration auf die Denaturierungsrate von LDH

Es sollte zunächst die Frage geklärt werden, welche D_2O-Konzentration den größten Wirkungsgrad gegen die Hitzeinaktivierung von LDH zeigt.

Dazu wurde das Enzym a) in H_2O-Puffer (pH 7,5)
b) in D_2O-Puffern steigender Konzentration

für 10 Minuten bei erhöhter Temperatur vorinkubiert. Nach Entnahme eines Aliquots der Lösungen wurde anschließend die Enzymaktivität (nur in H_2O!) im optischen Test nach WROBLEWSKI (277)bestimmt.
(Siehe zur Methodik auch ABB. 7 und METHODIK - M 1)
Das Enzym wurde in einer Konzentration von $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ mg/ml in H_2O-Puffer (pH 7,5) sowie D_2O-Puffern (gleicher pH-Wert) in Konzentrationen von 20,40,60,80 und 99,7% D_2O gelöst und für 10 Minuten bei 55°C inkubiert.
Anschließend wurde,wie oben beschrieben, sofort die Enzymaktivität bestimmt.

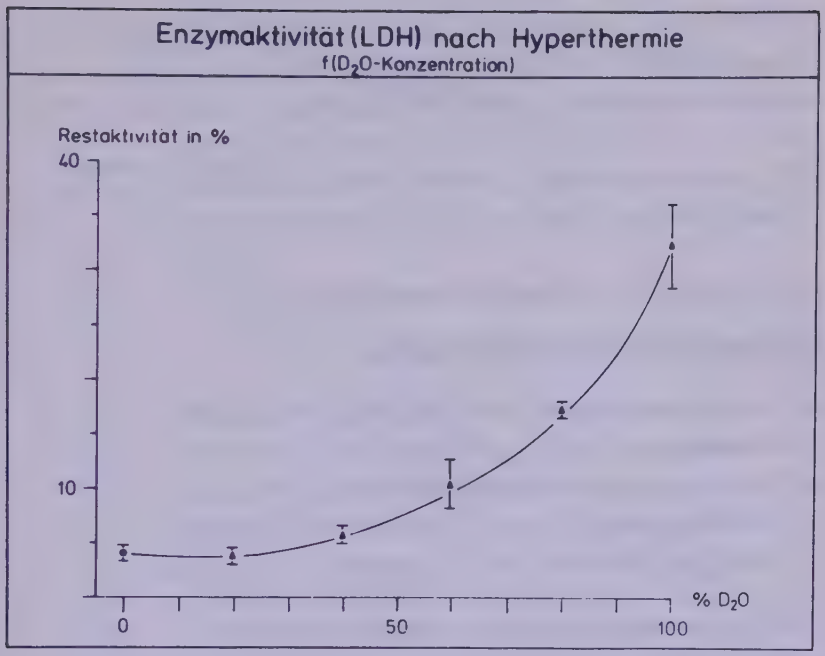


ABBILDUNG 2: Enzymaktivität (LDH) nach Hyperthermie in Abhängigkeit von der D_2O-Konzentration

---

LDH wurde in H_2O/ D_2O-Mischungen verschied.D_2O-Konzentration zu einer Endkonzentration von $2,5 \cdot 10^{-3}$mg/ml gelöst.
Medium: Phosphat-Puffer, 50mMol, pH 7,5 (siehe M 1)!
Jeweils ein Aliquot des Stamm-Ansatzes (2,0ml) wurde für 10 Min. bei 55°C hyperthermiert und anschließend die Rest-Aktivität (Ordinate) bei Standard-Bedingungen ermittelt.
Als 100%-Wert dienten die nicht hyperthermierten Lösungen (Inkubation bei 25° für 10 Min.).

Aufgetragen wurden Mittelwert und Standardabweichung (n= 3).

Zur Methodik siehe im Methodik-Teil M 1) und ABB. 6 !

Aus ABB. 2 ist ersichtlich, daß die Restaktivität von LDH (tatsächliche Enzymaktivität bezogen auf die Aktivität vonLDH bei 25°C) mit der Erhöhung der D_2O-Konzentration stark zunimmt. Während wir nach Schädigung des Enzyms bei 55°C in H_2O nur noch etwa 4% der Ausgangsaktivität wiederfanden, erhöht sich dieser Wert in 99,7%igem D_2O auf das 8-fache (ca. 32,5%). In D_2O wird also das Enzym LDH deutlich weniger geschädigt, und zwar je geringer, desto höher die D_2O-Konzentration ist.

Wir untersuchten im Folgenden die Schädigungsrate von LDH in

Abhängigkeit von der Schädigungstemperatur.

Mit zunehmender Temperatur erfolgt sowohl eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit als auch Zunahme der Denaturierung des Proteins, also zwei einanderentgegenlaufende Prozesse. Uns interessierte daher, ob sich bei verschiedenen Temperaturen ein unterschiedlicher Einfluß von D_2O bemerkbar machen würde.

Gemäß gleicher Methodik wurde das Enzym in der gleichen Konzentration

a) in H_2O-Puffer (pH 7,5)
b) in D_2O-Puffer (40 u.90%),

bei verschiedenen Temperaturen für 10 Minuten inkubiert.

Die Ergebnisse sind in ABB. 3 dargestellt:

Mit zunehmender Temperatur sinkt erwartungsgemäß die anschließend meßbare Enzymaktivität ab. Ein deutlicher Unterschied in der Schädigungsrate tritt erst bei Temperaturen ab ca. 45°C auf. Völlige Denaturierung von LDH tritt unter den gewählten Bedingungen in H_2O-Puffer bei ca. 56° ein, gegenüber ca. 61°C in 90%igem D_2O-Puffer. Die Werte für 40%iges D_2O scheinen recht interessant: Bis ca. 48° liegen sie sogar noch über denen von 90%igem D_2O, danach nimmt die Schädigung jedoch stark zu. Hier nähern sich

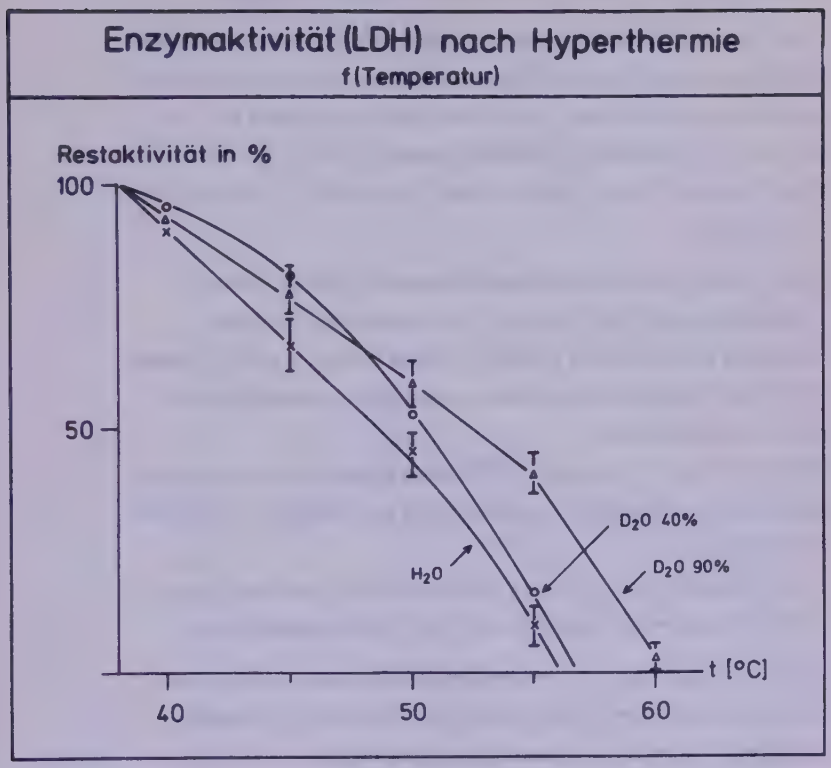


ABBILDUNG 3: Enzymaktivität (LDH) nach Hyperthermie in Abhängigkeit von der Schädigungstemperatur

LDH wurde in H_2O- bzw. D_2O-Puffer (40%, 90%) gelöst. Medium und Konzentration wie bei Abb. 2 angegeben. Jeweils ein Aliquot dieses Ansatzes wurde bei der in der Abszisse aufgetragenen Temperatur für 10 Min. inkubiert und anschließend bei Standard-Bedingungen die Restaktivität (Ordinate) bestimmt. Als 100%-Wert dienten bei 38°C für 10 Min. inkubierte Lösungen.

Aufgetragen wurden Mittelwert und Standardabweichung (n= 3).

Zur Methodik siehe M 1)!

die Werte dann denen des in Wasser inkubierten Enzyms.

Abhängigkeit vom pH-Wert während der Hyperthermiephase.

Da wir bei den bisherigen Untersuchungen den pH-Wert des Puffers während der Schädigungsperiode konstant bei 7,5 belassen hatten, sollte nun geprüft werden, ob sich ein unterschiedlicher pH-Wert während der Erwärmung bemerkbar machen würde.
Dazu wurde das Enzym wie im ersten Versuch für 10 Minuten bei 55° inkubiert.

ABB. 4 zeigt, daß die gemessene Enzymaktivität nach Hitzeschädigung bei ca. pH 6,5 in H_2O ein Maximum durchläuft. Niedrigere und besonders höhere pH-Werte führen zu einem starken Abfall der Restaktivität und damit zu vermehrter Schädigung der Lactat-Dehydrogenase.
Wird LDH in D_2O erwärmt, so liegt das Maximum der Meßwerte etwa bei pH 7,0, danach erfolgt bis pH 9 ein langsamer Abfall der Restaktivität.
Im pH-Bereich von 5 - 7 liegt die Restaktivität etwa bei 55% und in einem relativen Minimum bei pH 6,0 (50% Restaktivität).

D_2O vermindert also im schwach alkalischen Bereich eine Inaktivierung von LDH durch Hitze. Das Enzym erscheint in diesem pH-Bereich gegen Hitzedenaturierung stabilisiert.

Bei unseren Versuchen stellten wir fest, daß die nach Hitzeschädigung meßbare Restaktivität der LDH im Zusammenhang mit der angewendeten Protein-Konzentration steht.

Abhängigkeit von der Proteinkonzentration.

Während bei der bisher üblichen Konzentration von LDH von $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ mg/ml nach Schädigung bei 40° (bezogen auf $25^{\circ}C$) in Wasser eine Restaktivität von ca. 70% meßbar ist, erhöht sich

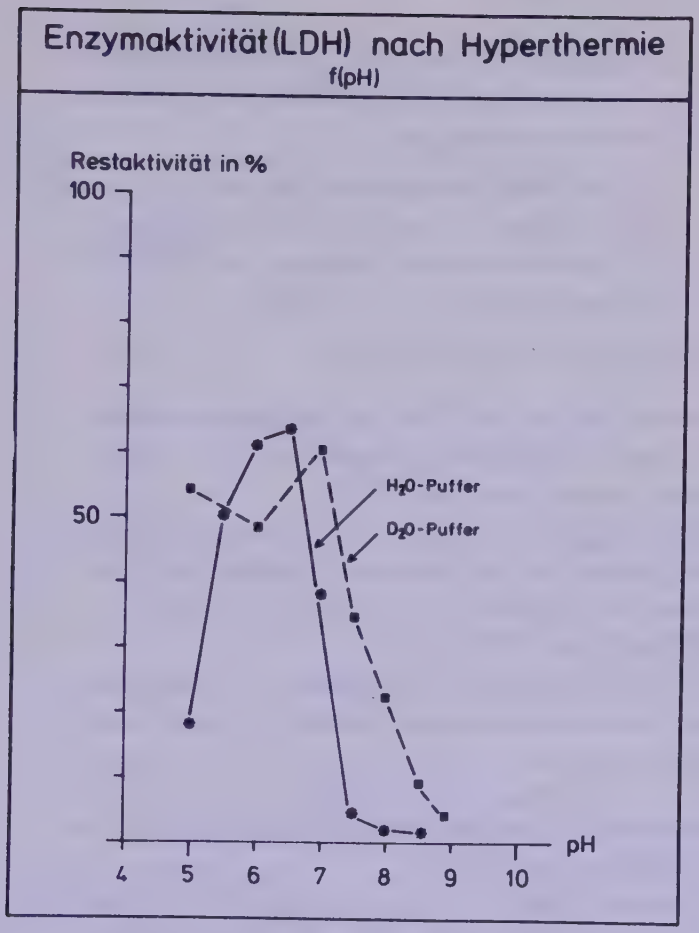


ABBILDUNG 4: Enzymaktivität (LDH) nach Hyperthermie in Abhängigkeit vom pH-Wert des Puffers bei der Hyperthermieperiode

LDH wurde in H_2O- bzw. D_2O-Puffer der pH-Werte 5 - 9 (Abszisse) gelöst. Die Konzentrationen entsprechen Abb. 2, ebenso die weitere Methodik.

Aufgetragen wurde die Restaktivität von LDH gegen den pH-Wert des Puffers während der Hyperthermie.

(n= 3)

dieser Wert bei Verdoppelung der Ausgangskonzentration auf $5 \cdot 10^{-3}$ mg/ml auf ca. 82%.

Lassen sich diese höheren Werte und damit die größere Stabilität des Enzyms nur durch höhere LDH-Konzentration oder auch durch Zusatz anderer Proteine erreichen ?

> Wir setzten der Ausgangskonzentration von LDH ($2,5 \cdot 10^{-3}$ mg/ml) steigende Mengen verschiedener Proteine zu und hyperthermierten die Lösungen nach der bisherigen Methode, und zwar bei 40° bzw. 55°C.

Die Ergebnisse sind in ABB. 5 dargestellt.

Wir stellten fest, daß die Resistenz von LDH gegen Hitzedenaturierung durch Zusatz größerer Mengen Albumin (Ei-, Serum-Albumin) gesteigert werden kann.
Betrachtet man die Ergebnisse für 40°C, so kann man feststellen, daß die Erhöhung der Proteinkonzentration mittels Albumin oder nur reines LDH in Wasser zu einer Zunahme der Restaktivität von ca. 48% auf ca. 82% führt.
Bei 55° Schädigungstemperatur sind dagegen in Wasser erheblich höhere Konzentrationen an Albumin erforderlich, um die normal meßbare Restaktivität von 4% auf ca. das 5-fache zu steigern.

Besonders deutlich zeigt sich der Einfluß der Proteinkonzentration nach Schädigung bei 55° in D_2O:
Durch steigende Mengen von z.B. Serumalbumin läßt sich hier die Denaturierung stark vermindern. Der Zusatz von 2,5 mg/ml bewirkt z.B. eine Steigerung der Restaktivität auf ca. das 3-fache (78%).

Eine Erhöhung der Resistenz des Enzyms gegen Hitzedenaturierung läßt sich nach unseren Feststellungen auch durch Zusatz anderer Proteine (z.B. der Enzyme Trypsin, Pepsin) erzielen.
Da jedoch durch diese möglicherweise störende Einflüsse auftreten, sollten diese dazu nicht Verwendung finden.

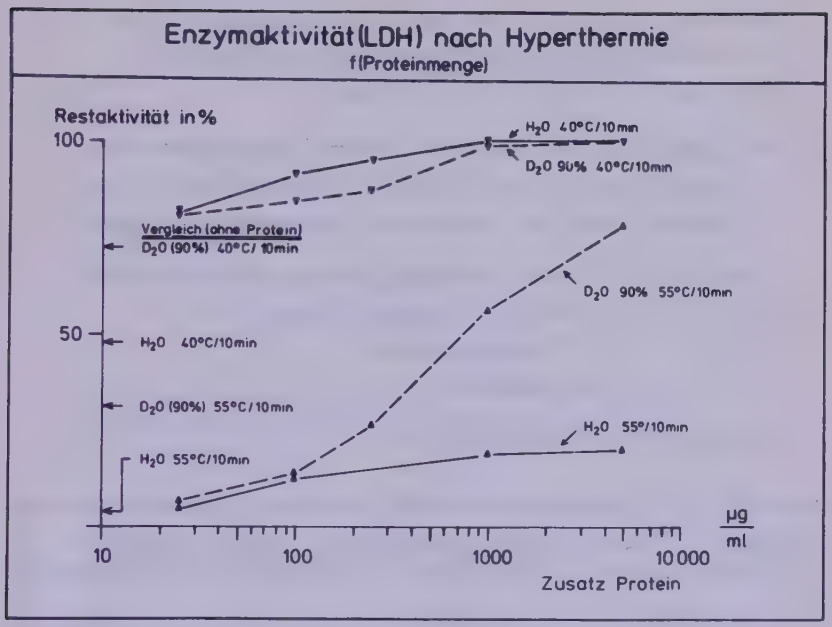


ABBILDUNG 5: Enzymaktivität (LDH) nach Hyperthermie in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration

LDH wurde in H_2O- bzw. D_2O-Puffer (Konz. u.Medium wie Abb.2)
a) ohne weitere Zusätze (Kontrolle)
b) mit steigenden Mengen BSA (250 - 5000 g/ml) -(Abszisse)- als Zusatz
gelöst und jeweils ein Aliquot dieser Ansätze bei 40° bzw. 55°C hyperthermiert.
Als 100%-Wert diente jeweils die nicht hyperthermierte Stammlösg. (25°C, Inkubation für 10 Min.).
Anschließend wurde die Restaktivität der LDH-Lösungen unter Standard-Bedingungen bestimmt (siehe M 1).

(n= 3)

Diskussion

Es war Ziel unserer Untersuchungen, festzustellen, ob Enzyme (hier: Lactat-Dehydrogenase) gegen Hitzedenaturierung in Deuteriumoxid stabiler sind als in Wasser.

Die Ergebnisse (ABB. 3) zeigen, daß die Schädigung von LDH in Wasser größer ist, als in D_2O (90%). Ein deutlicher "Schutzeffekt" zeigt sich jedoch erst bei Temperaturen ab ca. 50°C.

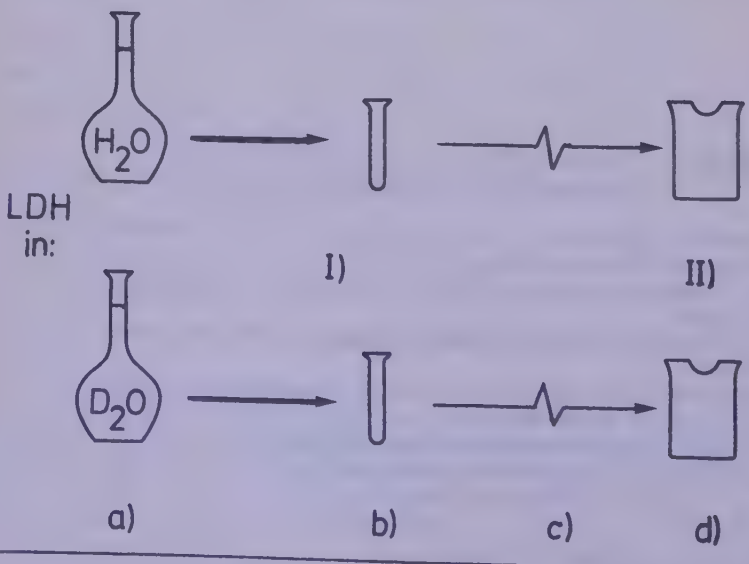
Verdeutlicht man sich den Ablauf der Versuche an einem Schema, so stellt man fest, daß sich in den beiden Phasen

I) Schädigungsphase

II) Meßphase

unterschiedliche Vorgänge abspielen:

ABB. 6: Versuchsanordnung (schematisch)



a) Auflösen des Enzyms in H_2O bzw. D_2O
b) Erhitzen eines Aliquots der Lösung (=SCHÄDIGUNG)
c) Verdünnen mit H_2O-Puffer
d) Messen der Enzymaktivität im optischen Test

Nach HVIDT (83) spielen bei der Messung und Bewertung des Wasserstoff-Isotopen-Austausches in Proteinen zwei Isotopieeffekte eine Rolle:

(1) Gleichgewichts-Isotopieeffekt
(2) Kinetische Isotopieeffekte.

Als wichtigste Voraussetzung für unsere weitere Betrachtung kann angenommen werden, daß der Gleichgewichts-Isotopieeffekt vernachlässigbar ist:
In nahezu 100% D_2O und 100% Wasser sind praktisch alle (Austausch "herein") oder keines (Austausch "heraus") der labilen Wasserstoff-Atome durch Deuterium substituiert, wenn das Austausch-Gleichgewicht eingetreten ist (LINDERSTRØM-LANG).

Wie erfolgt nun der H - D - Austausch?
Wie beeinflußt die D-Substitution die Stabilität des Enzyms?

Nach der Interpretation von LINDERSTRØM-LANG erfolgt der Austausch über Intermediär-Strukturen (I), die durch eine Konformationsveränderung der stabilen (nativen) Struktur (N) hervorgerufen werden:

$$N + D_2O \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} I\ (D_2O)$$

$$I\ (D_2O) \xrightarrow{k_3} \text{Austausch.}$$

Die Abhängigkeit von k_1 und k_2 von der völligen Isotopensubstitution im Lösungsmittel und im Protein wurde eindrucksvoll von

HERMANS und SCHERAGA bewiesen, die zeigten, daß die durch Temperaturänderung bewirkte Umwandlungstemperatur von Ribonuclease um ca. 5°C zunimmt, wenn der reversible Übergang in D_2O an Stelle von H_2O stattfindet. (136)

Es scheint daher der wesentliche Grund für die unterschiedlichen Denaturierungstemperaturen der H_2O-/D_2O-LDH-Lösungen auch in unseren Versuchen in der unterschiedlichen Beeinflussung der Proteinkonformationsänderung (k_1/k_2-Reaktion) zu liegen:

In unseren Versuchen findet die zunehmende Deuterierung des Proteins in der Schädigungsphase (I.) gleichzeitig mit einer zunehmenden Konformationsänderung des Proteins (Helix-Knäuel-Umwandlung) statt. Wird jedoch das Enzym nach bestimmter Zeit in das Meßsystem (H_2O) überführt, so findet der Rückaustausch statt.

$$\text{Enzym-H} + D_2O \rightleftharpoons \text{Enzym-D} + HDO \rightleftharpoons \text{Enzym-}D_2 + H_2O$$

Der Grad der Deuterisierung des Enzyms ($-D \longrightarrow D_2$) hängt sowohl von der Temperatur als auch vom pH-Wert der Lösung und von der vorliegenden D_2O-Konzentration ab.
Anders ausgedrückt:
Da pH-Wert und Temperatur den Entfaltungszustand eines Proteins beeinflussen, ist erklärlich, daß nur dann ein H-D-Austausch stattfinden kann, wenn die betreffenden H-Atome freiliegen und nicht noch in der stabilen Helix-Konfiguration eingeschlossen sind.

Bei LDH tauscht etwa die Hälfte der Peptid-Wasserstoffe ihr H schnell aus, 1/6 innerhalb von 5 Stunden und etwa 1/3 sehr langsam (2-3 Tage). Durch den Einfluß von pH, Temperatur und Detergenzien wird die Austauschrate jedoch erheblich gesteigert (122).

Verschiedene Veröffentlichungen lassen den Eindruck entstehen, daß die meisten Peptid-Wasserstoffbindungen in globulären Proteinen nach Deuteriumsubstitution in Abwesenheit des Lösungsmittels schwächer werden. Diese Vermutungen werden durch Messungen der

Hyperchromizität reiner deuterisierter Proteine bestätigt.

Wechselwirkungen der Lösungsmittel komplizieren diese Situation, doch gibt es Vermutungen, daß der größte Teil der Peptid-Wasserstoffbindungen nach Deuterierung auch in Wasser als Lösungsmittel schwächer wird.

In unseren Versuchen findet aber die Phasenumwandlung des Proteins (Helix ⟶ Knäuel) in Deuteriumoxid statt. Die erforderliche Aufspaltung der festeren D-Bindungen führt zu der schon bekannten (136) Erhöhung der Übergangstemperatur (die allerdings auch abhängig ist von der Größe und Struktur des Moleküls).

Wenn verschiedene intramolekulare Wasserstoffbindungen im Proteinmolekül aufgebrochen werden müssen, damit der Austausch eines bestimmten Wasserstoffatoms stattfinden kann, dann hängen die Isotopieeffekte k_1 und k_3 in der Hauptsache vom Grad der Deuterierung des Proteins ab. Kurven des kinetischen Protein-H-D-Austausches können hier daher nur als Näherung als eine Summe von Exponentialfunktionen 1.Ordnung beschrieben werden (HVI DT).

Die Bedeutung der angewendeten D_2O-Konzentration für den Deuterierungsgrad des Enzyms läßt sich aus ABB. 2 gut ersehen:
Als Folge des zunehmenden Deuterierungsgrades von LDH mit der Erhöhung der D_2O-Konzentration ist auch eine vermehrte Restaktivität im Sinne eines "Schutzeffektes" zu bemerken.
Interessant sind auch die Befunde, die in ABB. 3 dargestellt sind:

90%iges D_2O wirkt danach im Temperaturbereich bis ca. 45°C (bezogen auf Wasser, 25°) hemmend auf die Enzymaktivität. Erst bei Temperaturen ab 50° resultieren gegenüber Wasser deutlich erhöhte Werte der Restaktivität.
Dagegen liegt die Enzymaktivität niedriger D_2O-Konzentration (40%) im unteren Temperaturbereich deutlich über dem H_2O- bzw. D_2O-Wert. Erst bei Temperaturen ab ca. 50° fallen die Werte gegen 90%iges D_2O stark ab, liegen aber immer noch etwas höher als die vergleichbaren Wasserwerte. Die in diesem Falle ausgetauschten H-Atome

reichen nicht aus, um das Enzym bei stärkerer Wärmezufuhr konfigurativ zu stabilisieren.

Während hohe bzw. niedrige pH-Werte den H-D-Austausch stark begünstigen, findet der Austausch in einem weiten pH-Bereich (ca. 4 - 10) nur relativ langsam statt, wenn andere Einflüsse vernachlässigt werden können. Im allgemeinen liegen die meisten Proteine hier in stabiler Form vor.
Im Zusammenhang mit der Tatsache, daß die Herbeiführung einer kompakten Enzymstruktur zu verminderten H-D-Austausch führt, stehen wahrscheinlich die aus ABB. 4 ersichtlichen Ergebnisse:

Bei einem pH-Wert von 6,5 scheint das LDH-Molekül am stabilsten gegen Hitzedenaturierung zu sein (isoelektrischer Punkt ?).
Daraus kann geschlossen werden, daß hier eine stabile Molekülkonfiguration besteht.
Berücksichtigt man nun die Tatsache, daß sich der tatsächliche pD-Wert eines D_2O-Puffers zu

$$pD = pH + 0,44 \quad (24, 135)$$

errechnet, so ergibt sich daraus, daß nach unseren Ergebnissen bei diesem pH-Wert (ca.6,5) in D_2O der geringste H-D-Austausch zu erwarten ist. Tatsächlich ist bei diesem pH-Wert auch der Schutzeffekt von D_2O gegen thermische Denaturierung relativ gering (ABB. 4).

Da der in unseren Versuchen meist angewendete pH-Wert 7,5 eine ziemlich instabile Konformation herbeizuführen scheint (ABB. 4), sind dort der Grad und die Geschwindigkeit der Deuterisierung nur noch abhängig von der Temperatur und der vorliegenden D_2O-Konzentration.

Die Hitzestabilität verschiedener Proteine in D_2O läßt sich wahrscheinlich nicht nur auf den erfolgten H-D-Austausch und die damit

zur Denaturierung nötige höhere Aktivierungsenergie zurückführen, sondern möglicherweise auch auf ein anderes Phänomen:

D_2O ist nämlich ein schlechteres Lösungsmittel für denaturierte Proteine als H_2O. Dieser Lösungsmitteleffekt ist bekannt bei einer Zahl von Salzen und organischen Verbindungen mit polaren Gruppen. Dagegen sind Kohlenwasserstoffe in D_2O geringfügig besser löslich als in H_2O. Es wäre also denkbar, daß D_2O die hydrophoben Bindungen zwischen apolaren Seitengruppen des Enzyms weniger beeinflußt und damit zu einer Versteifung der Polypeptidkette bzw. Stabilisierung beiträgt.
Ein weiterer Grund für die Stabilisierung des Enzyms kann in der Beeinflussung der Ionenstärke, auf Grund der geringeren Dissoziation von D_2O, liegen.

Alle genannten Faktoren bewirken, daß Lactat-Dehydrogenase in D_2O gegen Hitzeschädigung weniger empfindlich ist, als in Wasser.

Die Untersuchungsergebnisse, nach denen höhere Proteinkonzentrationen zu einer geringeren Schädigungsrate von Enzymen führen, wird durch Untersuchungen anderer Autoren bestätigt (124 - 134).

Die Abhängigkeit der Denaturierungsrate von der Proteinkonzentration hängt in unserem Falle mit der Dissoziation des Enzymmoleküls in zwei bzw. vier Untereinheiten zusammen, sie ist proportional zur Dissoziationskonstanten, wenn der zweite Schritt (die Dissoziation in die Tetramere) langsam erfolgt. In diesem Fall bedeutet die Abhängigkeit der Denaturierungsrate von der Ausgangskonzentration des Proteins mit Zunahme der Temperatur und evt. der Ionenstärke der Lösung eine Verminderung der Assoziationskonstanten (124, 125, 126).
Unsere Ergebnisse stimmen überein mit anderen Untersuchungen (125, 127, 137) über den Einfluß der Temperatur und Ionenstärke auf die Dissoziation von LDH und mit der Erklärung der Abhängigkeit

der Denaturierungsrate von der Proteinkonzentration.

Nach ZIMMERMANN (123) wird durch verschiedene Proteine, so z.B. auch Serum-Albumin (BSA) die thermisch erzwungene Denaturierung intakter DNA unter Erhöhung der Enthalpie-Werte vermindert.
In Abhängigkeit vom Bindungspartner wird die Stabilität des Proteinmoleküls infolge der veränderten "hydrophoben Wechselwirkungen" unterschiedlich beeinflußt.

Durch eine Art von "Komplexierung" des LDH-Moleküls durch Serum-Albumin oder andere Proteine wird das Enzymmolekül an der Dissoziation gehindert, die Zahl der Rekombinationsmöglichkeiten nimmt zu. Dadurch wird das Enzymmolekül in Richtung einer geordneteren widerstandsfähigeren Konformation überführt und vor dem Kontakt mit den Lösungsmittelmolekülen geschützt.

Ähnliche Mechanismen werden u.a. für die schützende Wirkungsweise der Coenzyme angenommen und durch Verminderung des H-D-Austausches bestätigt (128 - 134).

Obwohl die Molekülgröße der Albumine (im Gegensatz zu derjenigen der Coenzyme) vergleichbar mit der Größe des Enzymmoleküls ist, und daher eine etwa gleich große Konzentration zu einem Schutz gegen thermische Denaturierung erwartet werden sollte, ist zu einer deutlichen Reduzierung der Schädigungsrate ein großer Albuminüberschuß erforderlich (s. ABB. 5).

Hier bedeutet erst die Verwendung von Deuteriumoxid und Albumin eine auffällige Verminderung der Denaturierungsrate.

3.1.2. Einfluß von D_2O auf die Harnstoff-Denaturierung von LDH

Zwar wurde die Denaturierung von Lactat-Dehydrogenase durch Harnstoff und andere Substanzen von einer Reihe von Laboratorien untersucht (140-144,147), uns interessierte jedoch, ob die Inaktivierung der LDH in Deuteriumoxid vermindert ist und welchen Einfluß der pH-Wert darauf ausübt.

Harnstoff, Guanidin und bestimmte andere chemische Verbindungen haben eine stärkere Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken als Wasser. Sie treten daher in Konkurrenz mit den Wasserstoffbrücken der Peptidbindungen des Wassers und führen zur Auflösung der Helixstruktur bis hin zur Zerlegung der Proteine in Untereinheiten.

Die Veränderung der Raumstruktur der Proteine durch Harnstoff führt daher zu einer "kompetitiven" Hemmung der Enzyme (145).

Untersuchungen mit Hilfe des H-D-Austausches haben gezeigt, daß mit der Bindung der Coenzyme eine Strukturveränderung der Proteinkonformation möglich ist und dadurch das Enzymmolekül gegen Denaturierung z.B. durch Harnstoff widerstandsfähiger ist.

Eine ähnliche Verminderung schädlicher Einflüsse auf Proteine ist auch durch Deuteriumoxid zu erwarten.

1) Hebt D_2O die denaturierende Wirkung von Harnstoff auf Enzyme auf ?

2) Welche Rolle spielt dabei der pH-Wert?

. Versuchsbedingungen:

Das Enzym (LDH) wurde in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-3}$ mg/ml in dem jeweiligen Puffer (Phosphat, 50mMol) in H_2O bzw. 90% D_2O gelöst und sofort die jeweilige Enzymaktivität bestimmt (Methodik M 1).
Diese Werte dienten als Vergleich (100%).
Die Harnstoff-Lösungen enthielten 1, 2 bzw. 3 Mol Harnstoff im jeweiligen Puffer, anschließend wurde der pH-Wert eingestellt.
Die Lactat-Dehydrogenase wurde darin in der gleichen Konzentration gelöst und bei 25°C (Thermostat) gehalten.

Aus den erhaltenen Meßwerten wurde graphisch die Halbwertszeit (HWZ) = $T_{1/2}$ (Zeit bis zum Absinken der Enzymaktivität auf die Hälfte des Ausgangswertes) ermittelt.

ERGEBNISSE:

Betrachtet man zunächst nur den Einfluß unterschiedlicher pH-Werte auf die Enzymaktivität, so stellt man fest, daß mit steigendem pH eine Abnahme der Stabilität des Enzyms erfolgt.
Innerhalb von 30 Minuten zeigte sich in den meisten Fällen eine mehr oder weniger starke Beeinträchtigung der Enzymaktivität, jedoch stellten sich innerhalb von 2 Stunden Grenzwerte von 60 - 70% der Ausgangsaktivität ein, die dann über viele Stunden konstant blieben.
Es war deshalb hier nicht möglich, eine biologische HWZ zu bestimmen.

Der Einfluß schädigender Harnstoff-Konzentrationen läßt sich aus TABELLE 3 bzw. ABB. 7 gut erkennen:

Auch hier nimmt die Denaturierung des Enzyms durch 1molaren Harnstoff mit Erhöhung der pH-Werte in Wasser zu.

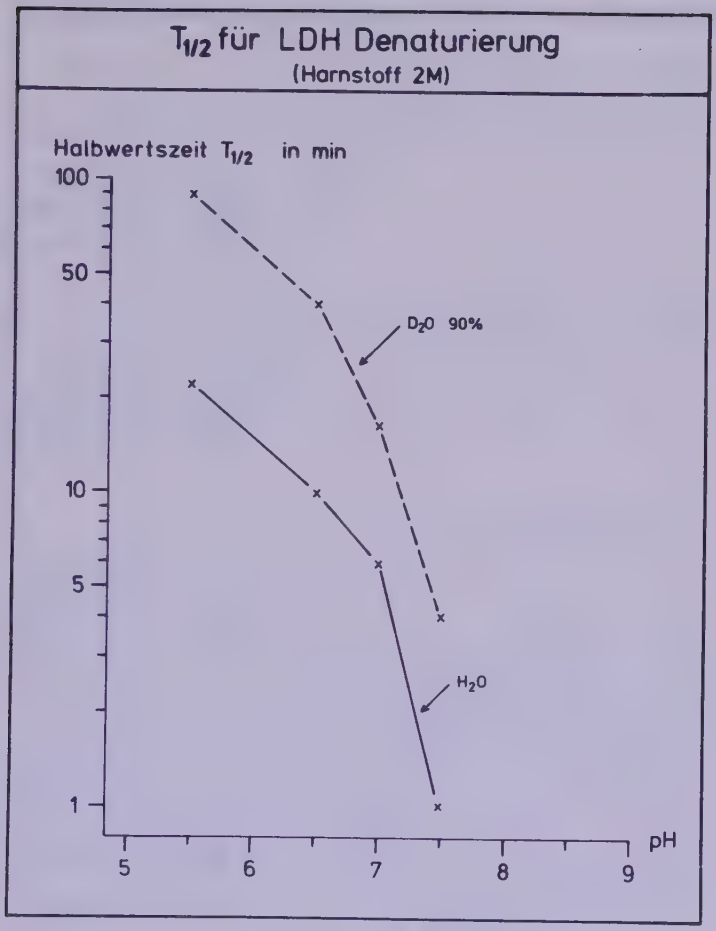


ABBILDUNG 7: LDH-Denaturierung durch Harnstoff (2 M) in H_2O bzw. D_2O
Halblogarithmische Darstellung zur Ermittlung der HWZ

LDH wurde in Puffer gelöst (Medium u.Konz. siehe Abb.2), der 1 bzw. 2 Mol Harnstoff enthielt. Anschließend wurde sofort unter Standard-Bedingungen die Enzymaktivität bestimmt (siehe M 1).
LDH-Lösungen ohne Harnstoff dienten als Vergleich.
Zu verschiedenen Zeiten (0 - 240 Min.) wurde jeweils die Enzymaktivität bestimmt (n= 2) und aus den so erhaltenen Meßwerten graphisch die HWZ ermittelt. (siehe auch TAB. 3).

Halbwertszeit $T_{1/2}$ für Harnstoff-Denaturierung von LDH			
pH-Wert	Harnstoff-Konzentr. (Mol)	H_2O	D_2O
5,5	0	nicht meßbar	nicht meßbar
	1	nicht meßbar	nicht meßbar
	2	22 Min.	90 Min.
6,5	0	nicht meßbar	nicht meßbar
	1	ca. 14 Std.	nicht meßbar
	2	10 Min.	40 Min.
7,0	0	ca. 12 Std.	nicht meßbar
	1	12 Min.	nicht meßbar
	2	6 Min.	16 Min.
7,5	0	ca. 10 Std.	nicht meßbar
	1	20 Min.	nicht meßbar
	2	1 Min.	4 Min.

TABELLE 3

Für die Versuchsbedingungen siehe Text bzw. Methodik-Teil M 1)!

Für D_2O-Lösungen gilt jedoch, daß im gemessenen pH-Bereich 1molare Harnstofflösungen das Enzym nicht wesentlich denaturieren. Es scheint im saueren pH-Bereich sogar eine Aufhebung der Hemmung von LDH durch Konkurrenz von D_2O und Harnstoff zu geben: Hier liegen die Meßwerte der Harnstofflösungen sogar über den Vergleichswerten mit reinem D_2O!

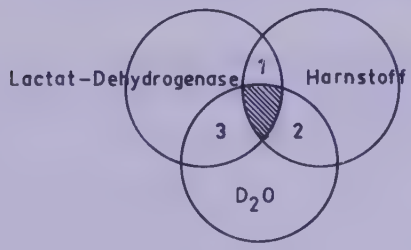
Bei 2molaren Harnstofflösungen zeigt sich der Schutzeffekt von D_2O am ausgeprägtesten (ABB. 7):

Die ermittelten Halbwertszeiten für die Harnstoff-Denaturierung von LDH liegen im Durchschnitt in D_2O um den Faktor 4 höher als diejenigen von H_2O. Die gemessene Restaktivität fällt mit steigendem pH, d.h. die Schädigung durch Harnstoff wird im alkalischen pH-Bereich größer.

Diskussion

Während bei der Stabilisierung von Lactat-Dehydrogenase gegen die Hitzedenaturierung in Deuteriumoxid überwiegend thermodynamische Isotopieeffekte eine Rolle spielen, sind im Falle der Harnstoff-Denaturierung insbesondere Lösungsmitteleffekte zu beachten.

Bei der Beurteilung dieser Phänomene haben wir es mit 3 Problemkreisen zu tun:



1) Dem Einfluß von Harnstoff auf das Enzym,
2) Dem Einfluß von D_2O auf den Harnstoff und
3) Dem Einfluß von D_2O auf die Lactat-Dehydrogenase.

Da im vorigen Kapitel auf die Wechselwirkungen zwischen Protein und Deuteriumoxid schon näher eingegangen wurde, soll dies hier nicht noch einmal diskutiert werden.

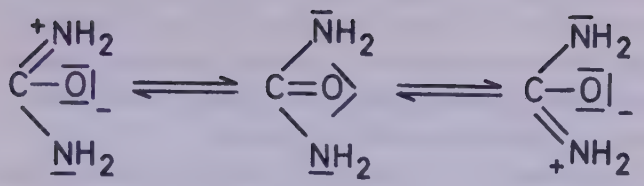
Einerseits nimmt die Zahl der sich langsam gegen Deuterium austauschenden Wasserstoffatome im Enzym durch bestimmte Einflüsse (pH, Temperatur usw.) zu, andererseits übt hier aber auch D_2O einen direkten Einfluß auf den Harnstoff aus, so daß es sich bei dem festgestellten denaturierungsverzögernden Effekt durch D_2O um eine Resultante aller Isotopieeffekte handelt.

Der direkte Einfluß der Deuterierung des Enzyms zeigt sich in einer mit der Konformationsänderung verbundenen Änderung der Enzymaktivität. Die festeren Deuterium-Bindungen verhindern bzw. verlangsamen jedoch auch den Harnstoff-Angriff auf das Enzym.

Da die Konformationsänderung wesentlich vom pH beeinflußt wird, ist auch der Grad bzw. die Deuterierungsgeschwindigkeit nur im Zusammenhang damit zu betrachten. Hier wiederum ist wichtig, wie D_2O auf Harnstoff einwirkt, denn beide Reaktionen laufen nebeneinander ab.

Harnstoff hat nur sehr schwach basische Eigenschaften, der pK_b beträgt 13,9.

Ähnlich den Carbonsäureamiden ist das Harnstoffmolekül durch folgende Mesomerie stabilisiert:

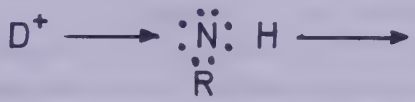


Harnstoff

In OH- oder NH- Bindungen verläuft ein Isotopenaustausch mit beliebigen Deuteriumverbindungen jedoch augenblicklich.

Nach Untersuchungen von SLUCKAJA (146) werden alle H-Atome des Harnstoff-Moleküls innerhalb kurzer Zeit gegen Deuterium ausgetauscht.

Der Mechanismus des H-D-Austausches ist wahrscheinlich der gleiche, der auch bei anderen N-H-Bindungen stattfindet:



Hier findet der Isotopenaustausch auf dem Wege der gleichzeitigen Anlagerung des Deuterons an ein Elektronenpaar und Abgabe eines Protons von einem anderen Paar statt.
Da dieser synchrone Prozess keine hohe Aktivierungsenergie erfordert, verläuft der Austausch sehr schnell.
(Der Austausch wird durch starke Säuren oder Basen katalysiert). (29, 33).
Die Folge dieser sofortigen Deuterierung des Harnstoffs ist eine geringere Reaktionsfähigkeit des D-Harnstoffs mit dem Enzym.
Es muß noch ein weiterer Gesichtspunkt berücksichtigt werden:

Die Dissoziationskonstanten von in D_2O gelösten Säuren bzw. Basen sind auf Grund der schon erwähnten erheblich niedrigeren Eigen-

dissoziation des Schweren Wassers kleiner als die Dissoziationskonstanten der gleichen Säuren oder Basen in normalem Wasser. Mit der Verringerung der Säure- bzw. Basenstärke durch geringere Dissoziation ergibt sich natürlich auch ein weniger stark denaturierender Einfluß des Harnstoffs auf Proteine.
Es ist daher erklärlich, daß basische pH-Werte, die die Dissoziation von Harnstoff begünstigen, den Effekt von D_2O vermindern.

Zusammenfassung:

1) Wird ein Enzym in D_2O statt in H_2O durch Hitze geschädigt, so zeigt sich eine eindeutige Verminderung der Schädigungsrate.
2) Für das Ausmaß der Denaturierung in Abhängigkeit von der Temperatur oder dem pH-Wert sind die D_2O-Konzentration und die Proteinkonzentration von Bedeutung.
3) Durch Zusatz bestimmter "Schutzproteine" (z.B. Serum-Albumin) läßt sich der Effekt von D_2O verstärken.
4) D_2O reduziert die Enzymdenaturierung durch Harnstoff.
5) Die Zunahme des pH-Wertes führt zu einer Verminderung des "Schutzeffektes" von Deuteriumoxid.

3.2. Der Einfluß von Deuteriumoxid auf Zellen und Gewebe

Zahlreiche Artikel der letzten Jahre befaßten sich mit den Einflüssen von Deuteriumoxid auf Pflanzen- und Tierzellen. Als übereinstimmendes Ergebnis der Autoren wird von der Hemmung der DNA-Synthese (105 - 107,161) oder der RNA-Synthese (161), der Protein-Synthese (103,163), von Mitosehemmung (161,163) und Verlangsamung enzymatischer Prozesse (149,171) berichtet.

3.2.1. Theoretische Vorbemerkungen:
Prinzipien der Methodik-

Bei der Vielfalt der möglichen kinetischen, thermodynamischen und Lösungsmittel-Isotopieeffekte (siehe dazu auch Kap. 2) ist es wünschenswert, die Beeinflussungsphase (Einbringen in D_2O) und die daran anschließende Meßphase (Überführung in H_2O-System) zu entkoppeln.

Wenn z.B. Aussagen über die biologische Beeinflussung von Enzymen in Zellen durch D_2O gemacht werden sollen, ist es zweckmäßig, zunächst die Zellen in D_2O zu inkubieren, dann jedoch in H_2O zu überführen und erst in diesem System nach bestimmter Zeit die verbliebene Enzymaktivität zu messen, da andernfalls die auftretende Reduzierung der Enzymaktivitäten in erster Linie eine Folge des reaktionskinetischen (chemischen) Isotopieeffekts darstellt.
Genauso sind Ergebnisse zweifelhaft, wenn z.B. gleichzeitig schädigende Einflüsse (Temperaturerhöhung, denaturierende Agenzien) auf Zellen o.ä. in D_2O und die Messung der Schädigungsraten in demselben System erfolgen (148).

Im ersten Falle beeinflußt die Temperatur stark die Reaktionsgeschwindigkeit,(nicht zu vergessen ist dabei die damit verbundene Erhöhung des Deuterierungsgrades der Proteine!), andererseits kommt bei Proteinen als ein weiterer Einfluß der Temperatur noch die denaturierende Wirkung hinzu, die einen schnellen Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit bedingt.

Das Ergebnis, nämlich die Resultante aus mehreren einander entgegengesetzt verlaufenden Prozessen, kann in diesen Fällen nicht eindeutig sein.
Gleiches gilt sinngemäß für Versuche, bei denen schädigende Substanzen auf Proteine oder Zellen in D_2O einwirken sollen, wobei gleichzeitig bestimmte Parameter gemessen werden.
Auch in diesen Fällen sind die Wechselwirkungen von Deuteriumoxid, evt. im Sinne einer Isotopenaustauschreaktion, mit den Agenzien in Betracht zu ziehen.

Aus den genannten Gründen wurde bei allen hier berichteten Versuchen mit Deuteriumoxid einheitlich verfahren (siehe auch ABB. 6):

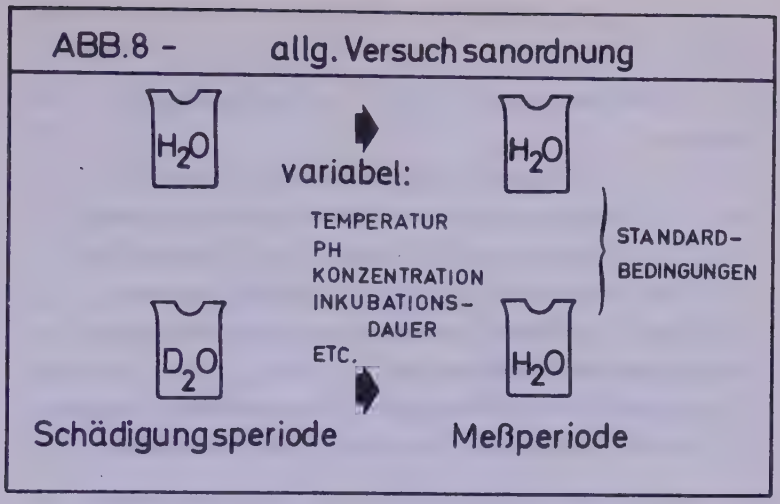
Enzyme, Zellen etc. wurden eine bestimmte Zeit dem Einfluß von D_2O (ggf. zusätzlichen Bedingungen wie Temperatur, pH usw.) ausgesetzt, diese "Beeinflussungsphase" wird im folgenden auch

SCHÄDIGUNGSPERIODE (I) genannt,

und erst anschließend erfolgte nach bestimmter Zeit die Messung der Parameter im einheitlichen H_2O-Puffer-System:

MESSPERIODE (II) -Standardbedingungen-.

Die allgemeine Versuchsanordnung wird aus umseitigen Schema ersichtlich:



Ein weiterer Aspekt erscheint mir in diesem Zusammenhang erwähnenswert:

Viele der biodynamischen Aussagen über die Halbwertszeit der Deuterium- oder Tritiumausscheidung bei Geweben wurden in in-vivo Experimenten ermittelt, bei denen eine höhere Konzentration als 50% D_2O nicht zur Anwendung gelangt (151 - 154), weil die Toxizität zu groß ist. Es lassen sich daher auch nicht alle Werte ohne weiteres auf Gewebeinkubationen übertragen.

Wir haben daher wegen der deutlicheren Effekte mit D_2O-Konzentrationen von ca. 90% gearbeitet.

Aus Gründen der Vereinheitlichung wurde die Inkubationszeit auf im allgemeinen 30 Minuten beschränkt, weil schon danach die für D_2O charakteristischen Effekte auftreten und außerdem so unerwünschte Sekundärwirkungen durch andere Einflüsse reduziert werden können (s.auch 149,150).

Unter Voraussetzung einer möglichen theoretischen Korrektur (24) wurden die Inkubationen für H_2O bzw. D_2O-Puffer bei gleichem pH-Wert durchgeführt. Damit wird der physikalische Isotopieeffekt zunächst mit in den biologisch auftretenden Effekt einbezogen.

Literatur

Die Empfindlichkeit gegen D_2O nimmt mit höher organisierten Lebewesen zu.
Dies wird z.T. mit der unterschiedlichen Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung zwischen Medium und intrazellulärem Wasser in Verbindung gebracht und hängt mit dem Vorhandensein eines großen komplexen Mitoseapparates zusammen, dessen mechanische Eigenschaften durch Deuterierung verändert werden. (Literatur über den Wasseraustausch 156 - 160).
Dadurch wird die DNA-Synthese besonders stark gehemmt, während RNA- und Protein-Synthese unterschiedlich beeinflußt werden.

Untersuchungen besonders von GROSS et al. (161 - 163) lassen darauf schließen, daß die Beeinflussung der DNA-Synthese nicht so sehr auf die Hemmung enzymatischer Prozesse während der Replikation, sondern auf strukturelle Veränderungen des DNA-Moleküls zurückzuführen ist.

Erste Beobachtungen über den Einfluß von D_2O auf Zellkulturen stammen von FISCHER (164), der Herzfibroblasten von Hühnerembryonen, Rous-Hühnersarkom und Mäusekarzinom-Kulturen untersuchte. Er fand eine fast linear mit der D_2O-Konzentration verlaufende Wachstumshemmung, die jedoch reversibel war. Das Wachstum der Sarkom- bzw. Karzinomzellen wurde schon bei Konzentrationen ab ca. 50% völlig gestoppt.

CAGIANUT (165) und SIEGEL (166) untersuchten Kulturen von Kaninchen-Bindegewebe bzw. HeLa-Zellen in D_2O. Beide berichten über Zell-Verklumpung und -Vergrößerung, Auftreten von Zellen mit mehreren Kernen, Pyknose der Zellkerne und verstärkte Vakuolen-Bildung.

Cytochemische Untersuchungen von MANSON (167, 168) an HeLa und L Zellen zeigten abgesehen vom Auftreten multinucleärer Zellen keine Unterschiede in der Anfärbbarkeit bei Ribonuclein-

säure (RNA) oder DNA, gemessen an der Pyronin- bzw. Feulgen-Färbung. Allerdings ist die Bedeutung der Versuche gering, da die Methode teils unzuverlässig, teils zu unempfindlich scheint.

KRUG und HÜBNER (169) kamen dann später zu anderen Ergebnissen und stellten fest, daß nach 2stündiger Inkubation von Ascites-Tumorzellen mit Schwerem Wasser (99,8%) die cytophotometrisch gemessene Feulgen-Aktivität (Reaktion auf Purindesoxiribonucleoside bzw. DNA) um ca. ein Fünftel abnimmt, während die Gallocyaninchromalaunfärbung (Reaktion auf saure Phosphatgruppen) praktisch nicht verändert wird. Die Tumoren blieben nach der Behandlung mit D_2O transplantabel.

Hier ist wohl ein Vergleich mit übereinstimmenden in-vivo Experimenten möglich:
Sowohl DICKEN et al. (106), als auch BRAY u. THOMSON (105) berichten über eine Verminderung der ^{32}P-Einbaurate in Kaninchen-DNA bzw. Rattenleber - DNA nach D_2O-Zufuhr.

ROTHSTEIN (170) beobachtete an HeLa-, L- und 5178-Zellen eine Zunahme des CO_2-Quotienten und eine Aufhebung des Crabtree-Effektes, d.h. die Zugabe von Glucose zum D_2O-Puffer führte nicht zur Verringerung des O_2-Quotienten.

Zwar befassen sich einige Autoren mit der Wirkung von D_2O auf Enzyme in vivo oder in vitro (171) oder mit den Transportmechanismen auf Zucker (172), jedoch wurde die Wirkung deuterierter Substanzen auf Zellen bisher nur von KATZ (4) untersucht.
Er bestimmte dabei die Isotopieeffekte von völlig deuterierter Glucose und Mannose bei der anaeroben Glykolyse von Ascites-Tumorzellen. Während er für die Deutero-Glucose keinen signifikanten Einfluß auf ATZ nachweisen konnte, führte der Einsatz der Deutero-Mannose zu einem starken Isotopieeffekt auf die Mannolyse und nahm mit steigender Temperatur geringfügig zu.

Es hat nicht an Versuchen gefehlt, die toxische Wirkung von Deuteriumoxid auf das Zellwachstum auch zur Tumorbeeinflussung auszunutzen (173 - 175).

Zwar konnte das Wachstum von Krebs-2 Ascites-Tumor in Mäusen beeinflußt werden, wenn die Tiere statt Wasser D_2O zu trinken erhielten, doch stellte sich auch hier wieder die toxische Grenze der D_2O-Konzentration im Körper mit ca. 40% heraus.
Das Wachstum der Tumorzellen konnte nur verlangsamt, die Tumoren jedoch nicht getötet werden.
Trotzdem konnten FINKEL, CZAJKA und KATZ gewisse Erfolge erringen:

Die Wirkung von 5-Fluoruracil, 6-Mercaptopurin und Thiophosphamid gegenüber Krebs-2-Tumor in Mäusen konnte durch Ersatz des Trinkwassers mittels 30% D_2O verstärkt werden (176).

HYPERTHERMIE - Literatur

Im Laufe der letzten Jahre ist das Interesse an einer schon länger bekannten Methode (177) zur Therapie des Krebses durch v.ARDENNE u.Mitarbeiter (178) wiedergeweckt worden, der vorschlug, durch Anwendung hoher Temperaturen ("HYPERTHERMIE") die Sensibilität von Tumorzellen gegen Chemotherapie zu vergrößern.

Da nun einerseits Deuteriumoxid bei den meisten Zellen zur Hemmung der DNA- bzw. RNA-Synthese führt und dadurch als "Mitose-Hemmer" eine interessante Bedeutung für die Anwendung in der Tumortherapie hätte, andererseits jedoch, wie bei Enzymen nachgewiesen, der Ersatz von H- durch D-Atome zu einer erhöhten Thermostabilität führt, interessierte uns der Einfluß von Deuteriumoxid und Hyperthermie auf Tumorzellen und Normalgewebe.

Ein spezifisch schädlicher Effekt hoher Temperaturen auf Tumorzellen ist sowohl experimentell (177, 180-202), als auch klinisch (203-210) untersucht worden.
Diese Versuche basieren auf älteren Beobachtungen, nach denen eine lokale Hyperthermie an günstig gelegenen Tumoren die Krebszellen zu zerstören vermag.
Widersprüchliche Ergebnisse lieferten jedoch Arbeiten von SCHMÄHL (211) und anderen Forschern, die in experimentellen Untersuchungen an Rattentumoren keinen Einfluß einer Ganzkörperhyperthermie auf das Tumorwachstum finden konnten (siehe dazu auch 212,213).
Dies wurde mit geringeren Unterschieden in der Wärmeempfindlichkeit der beiden Zellarten als bisher angenommen interpretiert (191).

Im Gegensatz zu der bekannten Tatsache, daß Normalgewebe (außer Hirnzellen) nicht besonders empfindlich auf Anwendung hoher Temperaturen reagiert, fanden MEYER u.WENZEL (148) eine starke Hemmung der DNA-Synthese nach Hyperthermie von Leber- und Nierenzellen.

Es ist daher ersichtlich, daß wir diese Angaben erst einer Prüfung unterziehen mußten, da ein stabilisierender Effekt von Deuteriumoxid nur bei einer tatsächlichen Beeinflussung der Zellen durch Hyperthermie festzustellen wäre.

3.2.2. Einfluß von D_2O und Hyperthermie auf Normalgewebe

Die von MEYER (148) durchgeführten Versuche der Hyperthermie von Leber- bzw. Nierenzellen wurden von uns wiederholt und konnten bestätigen, daß nach Anwendung der Zellisolierungsmethode von DULBECCO u. VOGT (214-216) die Zellen gegen Hyperthermie sensibilisiert werden, sodaß mit zunehmender Temperatur eine verstärkte Hemmung der DNA-Synthese erfolgt.

Es ist jedoch leicht einzusehen, daß die hierbei angewandte Methode die Zellen schon vor der eigentlichen Inkubation mit ^{3}H-Thymidin stark verändert.
Eine Kontrolle der DNA-Synthese bei 38°C in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer führte nicht zu einer Zunahme des ^{3}H-Thymidin-Einbaues in die DNA. Dies läßt auf eine starke Schädigung der Zellen während des Trypsinierens schließen.

> Unsere Befunde stimmen überein mit Untersuchungen von EASTY und MUTOLO, die fanden, daß nach 2stündigem Trypsinieren mit 0,2% Trypsin bei 37°C 70 bis 80% der isolierten Rattenleberzellen mit Lissamingrün anfärbbar waren, d.h. ein Zusammenbruch ihrer Permeabilität erfolgt war. Eine mechanische Schädigung war auszuschließen (217). Morphologische Untersuchungen an Leberzellen deuten auf eine Ablösung von Proteinen von der Zellmembran hin (218). Nach weiteren Untersuchungen ändert sich nach Trypsinieren der Zellen auch der K-Gehalt bzw. Na-Gehalt und die Rohrzucker-Penetration (219).

Auf Grund dieser Befunde, die darauf hindeuteten, daß die nach obiger Methode behandelten Nieren- bzw. Leberzellen nicht mehr als völlig intakt angesehen werden können, entschlossen wir uns, die Experimente mit Leberschnitten der Maus zu wiederholen.

Welchen Einfluß hat die Hyperthermie auf die DNA-Synthese intakter Leberzellen in H_2O bzw. D_2O ?

Leberschnitte (Maus)

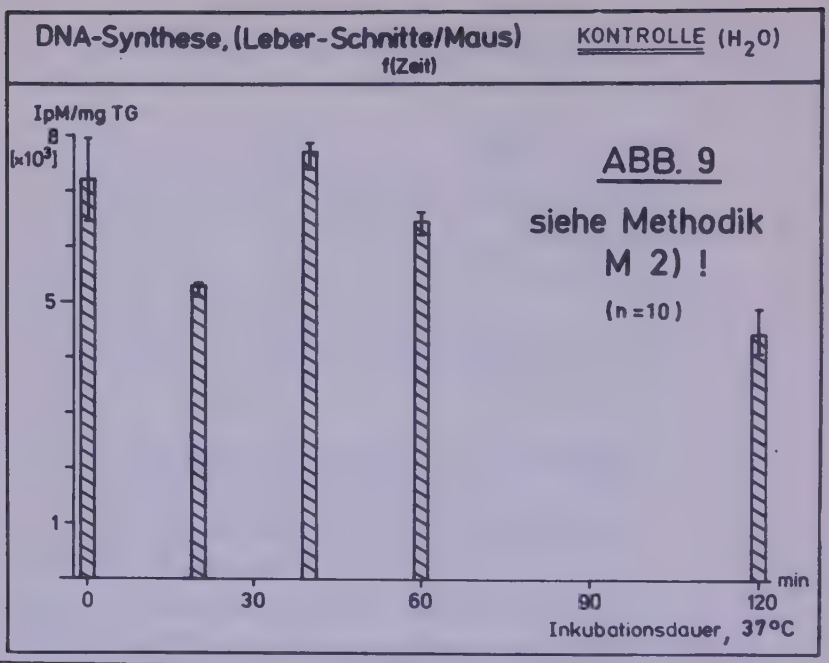
Obgleich die Messung von Gewebeverbänden im Vergleich zu Einzelzellen (Ascites-Tumorzellen, isolierte Zellen z.B.) nur bedingt Vergleichsmöglichkeiten erlaubt, entschieden wir uns für Leberschnitte, weil die Methode einmal eine schnelle Versuchsdurchführung ermöglicht und zum anderen die Leberzellen nicht schon vor der eigentlichen Inkubationsphase geschädigt werden.

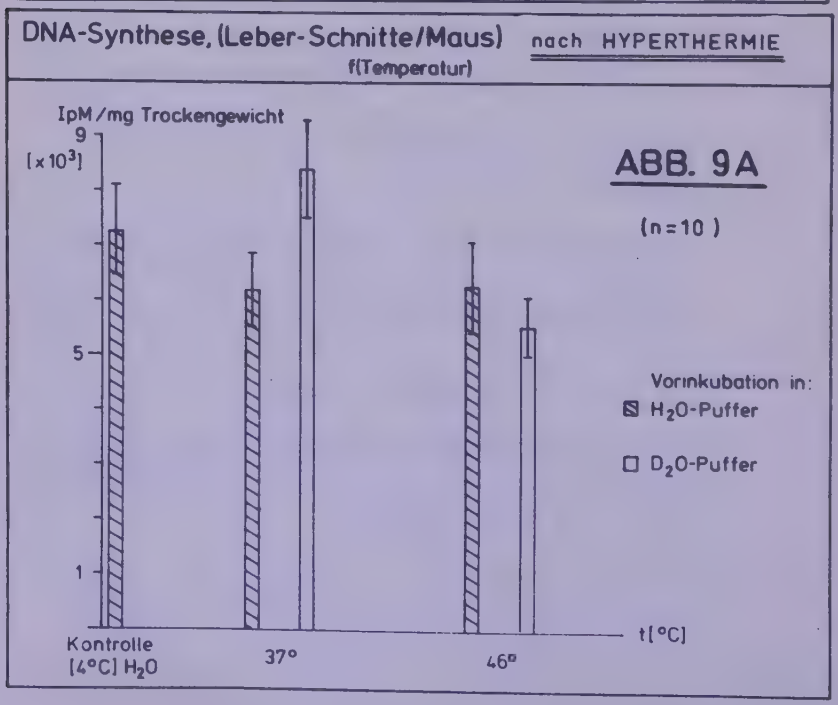
Die Leberschnitte wurden dazu bei verschiedenen Temperaturen in H_2O- bzw. D_2O-Puffer (90%), pH 7,4, inkubiert. Nach bestimmter Zeit wurden die Schnitte nach Abzentrifugation in frischem H_2O-Puffer (pH 7,4)-enthaltend ca. 5 μCi/ml ^{3}H-Thymidin- bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mittels Messung der Thymidin-Einbaurate die DNA-Synthese bestimmt.
(Siehe dazu 3.2.1. und Methodik M-2).

Die Versuche erbrachten folgende
Ergebnisse:

Die DNA-Synthese der Leber (Inkubation bei 37°C in H_2O-Puffer) bleibt bis 120 Minuten etwa konstant. (ABB. 9)
Bei Einhaltung konstanter Bedingungen ist die DNA-Synthese der bei 37° vorinkubierten Leberschnitte ebenso groß wie diejenige der bei 46°C in H_2O vorinkubierten Schnitte.

Die Thymidin-Einbaurate liegt bei Leberschnitten, die bei 37°C in D_2O vorinkubiert worden waren, signifikant ($p \simeq 0{,}0005$) höher als der entsprechende H_2O-Wert.
Bei 46°C liegt die Thymidin-Einbaurate (in D_2O) unter der von in H_2O hyperthermierten Schnitten. (ABB. 9 A)


DNA-Synthese, (Leber-Schnitte/Maus)
f(Zeit)
KONTROLLE (H_2O)
IpM/mg TG
8
[x10³]
5
1
0
30
60
90
120
min
Inkubationsdauer, 37°C
ABB. 9
siehe Methodik
M 2) !
(n=10)


DNA-Synthese, (Leber-Schnitte/Maus)
f(Temperatur)
nach HYPERTHERMIE
IpM/mg Trockengewicht
9
[x10³]
5
1
Kontrolle
[4°C] H_2O
37°
46°
t[°C]
ABB. 9A
(n=10)
Vorinkubation in:
H_2O-Puffer
D_2O-Puffer

Zusammenfassung und Diskussion

Wir konnten nachweisen, daß Leberschnitte zumindest kurze Zeiten 46°C ausgesetzt werden können, ohne eine irreversible Schädigung ihrer DNA-Synthese zu erleiden. (siehe auch 191 !)

Das Ergebnis zeigt uns, wie wichtig es ist, nicht Tumorzellen mit beliebigen Normalzellen zu vergleichen.

Abgesehen von der Bedeutung unterschiedlicher Spezies (s. dazu 190a) spielt die (Vor-)Behandlung der Zellen eine wichtige Rolle:

1. Auf Grund unterschiedlicher Vorbehandlung bei der Isolierung der Zellen kommt es evt. zu einer Veränderung der Membranpermeabilität. Dies ist möglicherweise ein Grund für die danach auftretende schädigende Wirkung hoher Temperaturen (s. 148!).
   Es kann jedoch auch als Folge der Membranschädigung zu vermehrter Ausschüttung proteolytisch wirkender Enzyme kommen, die die eigene Zelle schädigen (lysosomale Reaktion, s.178) oder aber zu einer vermehrten Spaltung des als Tracer verwendeten ^{3}H-Thymidins führen.
   Ein vermindertes Thymidin-Angebot führt jedoch zu einer kleineren Einbaurate, die somit fälschlich eine verminderte DNA-Synthese anzeigt.

2. Die Erhöhung der Temperatur führt einerseits zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit (also auch größerer Enzymaktivität).
   Andererseits nimmt ab ca. 40° die Denaturierung der Proteine zu.
   Bei ungeeigneter Versuchsanordnung (siehe dazu 3.2.1.) erhält man daher nur Mischeffekte, die keine eindeutige Aussage zulassen.
   Möglicherweise wird hierbei die Inaktivierung des angebotenen (extracellulären) Thymidins begünstigt und eine verminderte Einbaurate vorgetäuscht.

Über den Einfluß von Deuteriumoxid kann hier noch keine eindeutige Aussage gemacht werden.

Die Tatsache, daß die DNA-Synthese bei 37°-Vorinkubation in D_2O erhöht ist (ABB. 9A), in Verbindung mit der Beobachtung, daß die Leberschnitte im Unterschied zu in H_2O vorinkubierten Schnitten weniger quellen bzw. sich auflösen (was sich in einer verminderten Trübung der D_2O-Pufferlösung zeigt), läßt darauf schließen, daß

Deuteriumoxid möglicherweise an einer Stabilisierung der Membranen beteiligt ist.
Eine Verminderung der Trübung des D_2O-Puffers läßt sich auch nach Hyperthermie bei 46° beobachten, doch überwiegen hier Effekte, die zu einer Reduzierung der Thymidin-Einbaurate führen.

Weitere Aufschlüsse können möglicherweise die Untersuchungen mit Tumorzellen erbringen.

3.2.3. Der Einfluß von Hyperthermie und D_2O auf Tumorzellen (Ehrlich-Ascites-Tumor)

Nachdem auch von uns nachgewiesen werden konnte, daß hohe Temperaturen keine signifikante Schädigung von Normalgewebe im Bezug auf ihre DNA-Synthese hervorrufen können, sollte geklärt werden, ob Ascites-Tumorzellen durch Hyperthermie geschädigt werden können.
Eine besondere Empfindlichkeit von Tumoren gegen Temperaturen über 37°C ist aus der Literatur bekannt (177, 180 - 202).

Insbesondere folgende Fragen sollten hier geklärt werden:

1) Welche Schädigungen ruft Hyperthermie hervor auf die DNA-Synthese, aerobe Glykolyse, ATP-Bilanz und Morphologie von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen?
2) Können diese Schädigungen durch D_2O vermindert werden?
3) Ist der Einfluß von D_2O konzentrationsabhängig?
4) Können auch andere Noxen (z.B. Zytostatika) in ihrer Wirkung auf Tumorzellen durch D_2O verringert werden?

A) TEMPERATUR-SCHÄDIGUNG

a) Die Beeinflussung der DNA-Synthese

Bei der Durchführung der Versuche richteten wir uns im wesentlichen nach der von STÖHR und WENZEL (227) aufgestellten Forderung nach Entkopplung von Schädigungs- und Meßperiode (Vgl. 3.2.1.,ABB.8).

Der Einfluß der Temperatur auf die DNA-Synthese

Die Tumorzellen ("ATZ") wurden jeweils in H_2O- bzw. D_2O-Puffer (90%) für 30 Minuten bei steigenden Temperaturen vorinkubiert und anschließend die DNA-Synthese bei 37° in H_2O-Puffer mittels ^3H-Thymidin-Einbau bestimmt. (Methodik M 4).

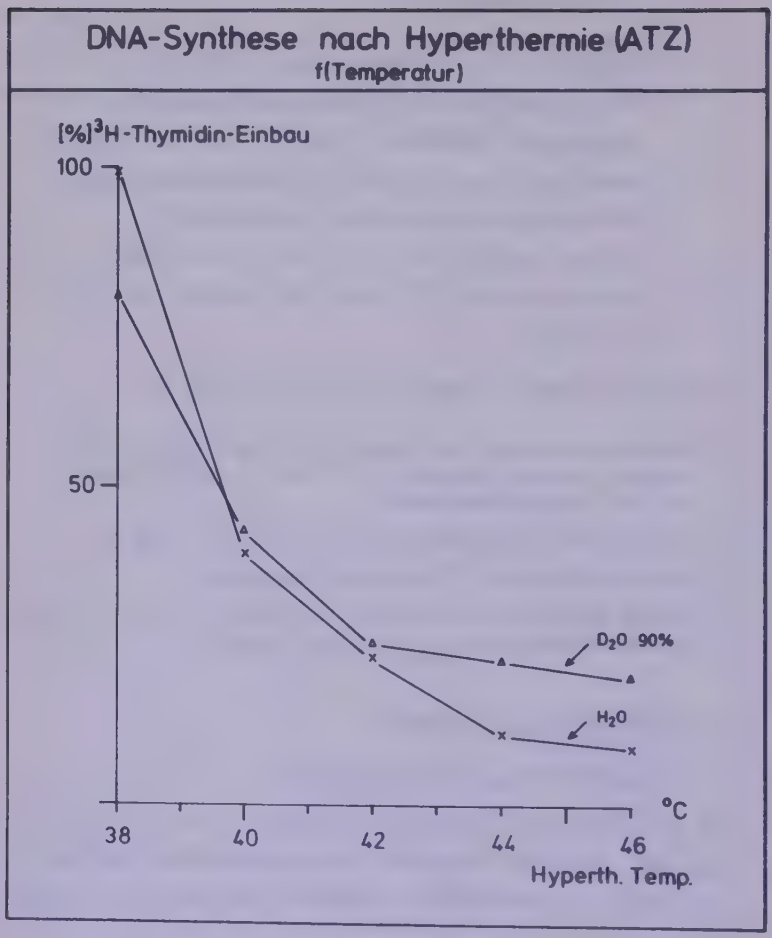


ABBILDUNG 10: Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNA von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen nach Hyperthermie in H_2O- bzw. D_2O-Puffer (90%)

Inkubationsmedium: Krebs-Ringer-Phosphatpuffer, pH 7,4 in H_2O // D_2O
Jeweils ein Aliquot (1,0 ml) des Ansatzes (4%ige Zellsuspension) wurde bei der angeführten Temperatur für 30 Minuten vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der DNA-Synthese in H_2O-Puffer bei 38°C (Standard-Bedingungen) - siehe M 4) und Abb. 8!

(n= 5)

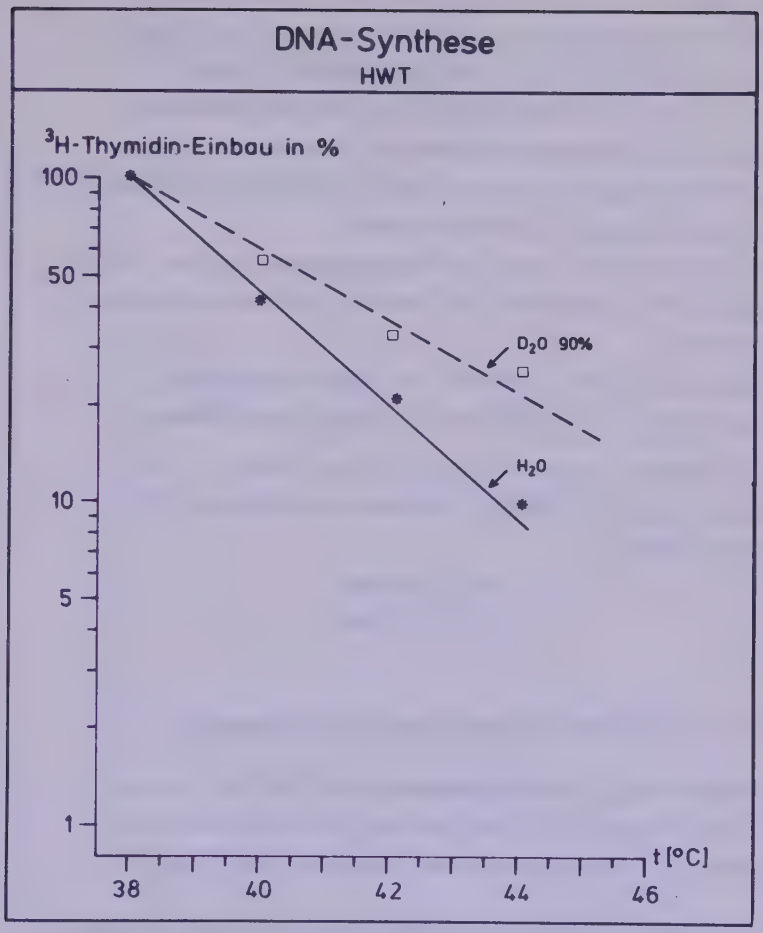


ABBILDUNG 10 A: DNA-Synthese (ATZ) nach Hyperthermie

Halblogarithmische Darstellung zur Ermittlung der Halbwertstemperatur

Werte und Versuchsbedingungen siehe Abb. 10!

Die Resultate gibt ABB. 10 wieder.

Schon bei 38°C zeigt sich der aus der Literatur bekannte Hemmeffekt von Deuteriumoxid auf die DNA-Synthese: Die Thymidin-Einbaurate erreicht nur etwa 80% des H_2O-Kontrollwertes.
Aus der ABB.10 ist der drastische Abfall der DNA-Synthese mit zunehmender Schädigungstemperatur gut zu erkennen.
Nach 30 minütigem Erwärmen auf 46°C wird die DNA-Synthese der Ascites-Tumorzellen um 90% reduziert.
In D_2O tritt die Senkung der Thymidin-Einbauraten auch auf, jedoch liegen die Einbauraten ab ca. 42° deutlich über den vergleichbaren H_2O-Werten.
Dies entspricht dem von WENZEL und STÖHR sowie MEYER formulierten "Schutzeffekt" gegen Hyperthermie-Schädigung.

Die graphisch ermittelten Temperaturen (vgl. ABB. 10 A) zur Reduzierung der ^3H-Thymidin-Einbauraten auf die Hälfte (HWT) ergeben sich zu:

39,75° für H_2O-Puffer
41° für D_2O-Puffer.

Der Einfluß der Inkubationsdauer auf die DNA-Synthese

Betrachtet man nur die Temperaturen von 38° und 46°, so interessierte uns, ob sich der Grad der DNA-Schädigung durch Veränderung der Inkubationsdauer noch verstärken ließe. (ABB. 11)

Als Vergleich dienten in diesem Fall nicht vorbehandelte Ascites-Tumorzellen (in Eis gehalten) = 100%-Wert.

Man erkennt, daß die DNA-Synthese von Tumorzellen, die bei 38° vorinkubiert wurden, schon nach 15 Minuten gegenüber den Kontrollwerten um etwa 35% vermindert ist. Dieser Wert bleibt dann über 60 Minuten ziemlich konstant.

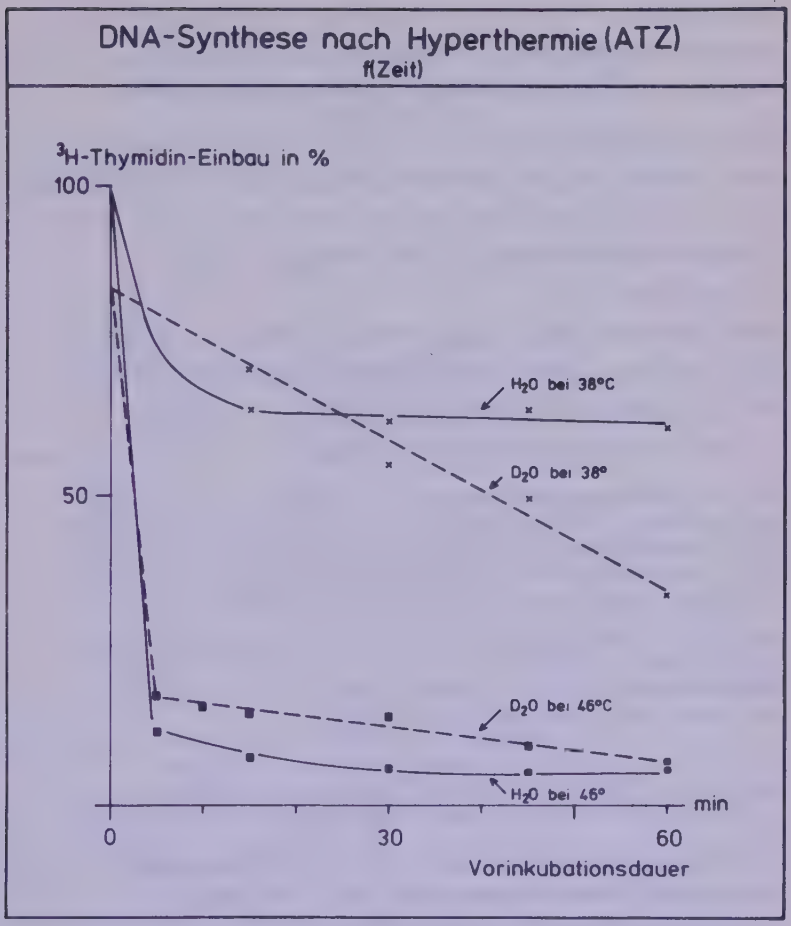


ABBILDUNG 11: DNA-Synthese (ATZ) nach Hyperthermie in Abhängigkeit von der Vorinkubationsdauer

Inkubationsmedium: Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4 in H_2O // D_2O
Jeweils ein Aliquot (1,0 ml) der Zellsuspension (ca.4%ig) wurde bei 38° bzw. 46° für die in der Abszisse angegebene Zeit vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der DNA-Synthese unter Standard-Bedingungen (siehe M 4).

(n= 5)

Dagegen führt die Vorinkubation in D_2O bei 38° mit zunehmender Dauer zu einer stärkeren Hemmung der DNA-Synthese. Während sich zu Beginn des Versuchs wieder die normale (schon bekannte) Hemmung von ca. 80% des Kontrollwertes zeigt, beträgt der Wert nach 60 Minuten nur noch ca. 35% der Kontrolle.

Die Vorinkubation der Tumorzellen bei 46° führt schon innerhalb von 5 Minuten in H_2O zur drastischen Reduzierung der DNA-Synthese (11%). In den weiteren 55 Minuten sinkt der Wert kaum noch, d.h. eine wesentliche Schädigung ist schon innerhalb der ersten 5 Minuten erfolgt.
Das Gleiche zeigt sich in D_2O, nur liegen die Werte hier allgemein höher. Während die DNA-Synthese nach 30minütiger Vorschädigung in D_2O gegenüber H_2O noch deutlich erhöht ist, ist nach 60 Minuten der gleiche Wert erreicht wie in H_2O.

Die von uns angewandte Methode zur Messung der DNA-Synthese ermöglicht nicht, eindeutig festzustellen, ob die Zellen tatsächlich gleich stark geschädigt wurden, oder ob die mit zunehmender Dauer bzw. erhöhter Temperatur zunehmende Deuterierung nur zu einer scheinbaren Reduzierung der DNA-Synthese geführt hat.

Da frühere Untersuchungen anderer Forscher von einer reversiblen Mitose-Hemmung durch D_2O berichten, müßte man zur Klärung dieses Problems zwischen Schädigungsperiode und Meßperiode noch eine "Regenerationsperiode" schalten.

Der Einfluß der D_2O-Konzentration während der Hyperthermieperiode

Bei den vorangegangenen Versuchen war uns aufgefallen, daß die Hemmung der DNA-Synthese durch D_2O bei den Kontrollen (ungeschädigte Zellen) unterschiedlich war.
Wir hatten uns in der bisherigen Methodik größtenteils an frühere Vorschriften (227) gehalten und die Tumorzellen in 90%iges D_2O eingebracht. Es schien jedoch auf Grund unterschiedlicher Verdünnungsverhältnisse möglich, daß verschiedene D_2O-Konzentrationen nicht nur die Kontrollwerte beeinflussen, sondern auch unterschiedliche Effekte bei der Hyperthermie hervorrufen würde.

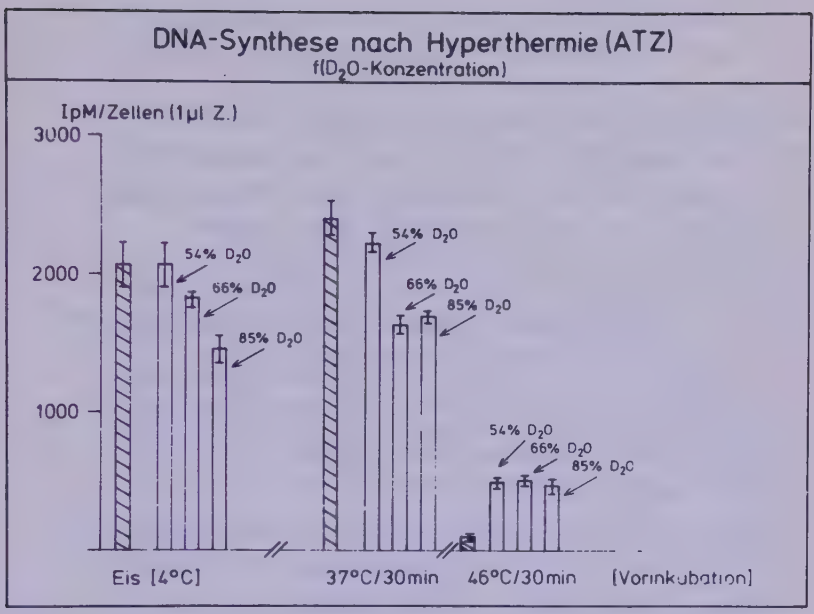


ABBILDUNG 12: DNA-Synthese (ATZ) nach Hyperthermie in Abhängigkeit von der D_2O-Konzentration

Inkubationsmedium: wie bei Abb. 11, jedoch bei D_2O verschiedene Konzentrationen (0, 54, 66, 85%ig).
Ein Aliquot (1,0 ml) der jeweiligen Zellsuspension (ca. 4%ig) wurde bei 37° bzw. 46°C für 30 Min. vorinkubiert und anschließend unter Standard-Bedingungen die DNA-Synthese bestimmt (siehe M 4).

Aufgetragen wurden die Mittelwerte mit Standardabweichung (n= 3).

Die Tumorzellen wurden nach dem Waschen zu einem Teil in H_2O-Puffer aufgenommen, zum anderen Teil 1, 2 und 3 mal mit 90%igem-D_2O-Puffer gewaschen und davon Proben entnommen, die anschließend zur Gehaltsbestimmung verwendet wurden (siehe Methodik M 5).

Es konnte nachgewiesen werden, daß je nach der verwendeten Zellmenge, die in 90%igem D_2O aufgenommen wurde, bzw. je nach Häufigkeit der "Verdünnung" des den Zellen anhaftenden Wassers mit D_2O auch bei großem D_2O-Überschuß unterschiedliche D_2O-Konzentrationen zwischen ca. 60 bis 80% vorlagen.

Bei dem in ABB. 12 dargestellten Experiment lagen nach dem Waschen der Zellen D_2O-Konzentrationen von 54%, 66% und 85% vor.

Bei Aufbewahrung der Tumorzellen in Eis (Kontrolle) ist die durch D_2O hervorgerufene Hemmung der DNA-Synthese von der vorliegenden D_2O-Konzentration abhängig:
Mit Erhöhung der D_2O-Konzentration nimmt der Grad der Hemmung zu. Während sich hier eine ca. 54%ige D_2O-Konzentration noch nicht bemerkbar macht, ist die DNA-Synthese bei 85%igem D_2O auf 70% des Vergleichswertes (H_2O) erniedrigt.
Ähnliche Verhältnisse gelten auch für die Temperatur 38°C.
Bei der Hyperthermie-Temperatur 46°C unterscheiden sich die D_2O-Werte nicht mehr voneinander. Alle drei verschiedenen D_2O-Konzentrationen haben den gleichen "Schutzeffekt" gegenüber H_2O.

Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, zur Verminderung der Toxizität hoher D_2O-Konzentrationen nur noch niedrige Konzentrationen (z.B. 50%) zu verwenden, bei denen der gleiche "Schutzeffekt" gegen Hyperthermieschädigung vorhanden ist.

Weiterhin zeigt sich, daß unterschiedliche Versuchsergebnisse anderer Autoren über die biologischen Wirkungen von D_2O wahrscheinlich mit den verwendeten Konzentrationen zusammenhängen.

Der Einfluß der Glucose-Zufuhr während der Hyperthermie

Bei unseren Versuchen fielen uns die voneinander abweichenden ^{3}H-Thymidin-Einbauraten der Kontrollen auf.

3 Ursachen dafür wären zu diskutieren:

1) Möglicherweise sind dafür die verwendeten Thymidin-Lösungen unterschiedlicher spezifischer Aktivität (2 - 5 Ci/mMol) verantwortlich.

2) Ein weiterer Grund könnte sein, daß Tumorzellen im Alter von 7 - 10 Tagen nach inoc. verwendet wurden, die somit einen unterschiedlichen Gehalt an "toten" Zellen haben konnten.

   Eine Kontrollmöglichkeit ergibt sich dafür aus der Anwendung von Anfärbeverfahren (228), wie sie in einigen Versuchen von uns auch vergleichsweise durchgeführt wurden. Der Fehler läßt sich aber auch ziemlich konstant halten, wenn nur Zellen eines bestimmten Alters (z.B. 7 Tage) verwendet werden.

3) Uns schien auch noch ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Einbauraten der Kontrollen möglich:
   Die Anwesenheit unterschiedlicher Glucosemengen bei der Vorinkubation.

Es ist bekannt, daß der gleichzeitige Zusatz von Glucose während der Inkubation mit z.B. ^{3}H-Thymidin die Einbauraten in die DNA stark erhöht.
Wir konnten z.B. für diesen Fall nachweisen, daß der Thymidin-Einbau durch Glucose (19 mMol) um ca. das 4 fache zunimmt.

Dies hängt z.T. zusammen mit der Steigerung der Syntheseleistungen der Zelle durch Glucose (236, 237).
Eine andere (in der Literatur widersprüchlich dargestellte) Erklärung ist der mit der Glucosegabe verbundene Anstieg des ATP-Spiegels (234, siehe auch ATP-Bilanz 3.2.3. b).

Andererseits wird unter enzymatischem Einfluß oder mit zunehmender Temperatur das Thymidin rasch zu Thymin metabolisiert, welches dann nicht mehr in die Zelle (bzw. DNA) eingebaut wird (229). Durch Glucose wird jedoch diese Inaktivierung verzögert, sodaß der daraus resultierende Thymidinspiegel zu einer höheren Einbaurate führt (230).

Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch das Inkubationsmedium:

Nach eigenen Beobachtungen führen z.B. Phosphat-Puffer zu höheren Einbauraten als physiologische NaCl-Lösungen oder andere Puffer-Lösungen.

Welchen Einfluß hat die Gabe von Glucose während der Hyperthermie-Periode auf die anschließende DNA-Synthese von Tumorzellen?

Zur Klärung der Frage inkubierten wir die Tumorzellen (ATZ) bei 38° und 46°C jeweils mit und ohne Glucose (3,4 mg/ml) für 30 Minuten. Als Kontrolle dienten wieder Zellen, die während des Versuchs in Eis gehalten worden waren.
Nach Abzentrifugation der Zellen wurde unter den üblichen Bedingungen (ohne Glucose) mittels Thymidin-Einbaus die DNA-Synthese bestimmt (Methodik M 4).

Es zeigte sich (ABB. 13), daß bei in Eis gehaltenen (ungeschädigten) Tumorzellen in H_2O-Puffer die Gabe von Glucose kaum einen Einfluß hat.
Bei 38°-Vorinkubation ist jedoch hier eine deutliche Erhöhung der DNA-Synthese durch den Glucosezusatz festzustellen. Der Wert dieser mit Gluocse vorinkubierten Zellen erreicht fast den Kontrollwert der ungeschädigten Zellen.
Die Temperaturerhöhung auf 46° führt in beiden Fällen zur schon bekannten drastischen Einschränkung der DNA-Synthese. Hier aber führt die Glucosegabe zur Erhöhung der Thymidin-Einbaurate um fast 100%.

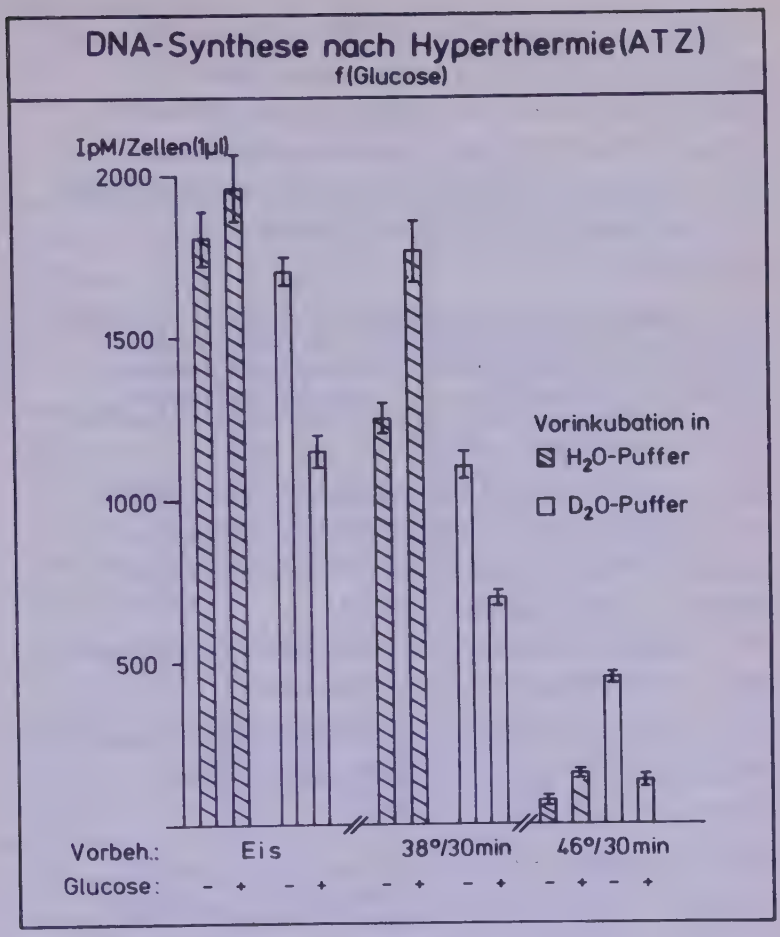


ABBILDUNG 13: DNA-Synthese (ATZ) nach Hyperthermie in Abhängigkeit von der Glucosegabe bei der Hyperthermieperiode

Inkubationsmedium: wie bei Abb. 11, bei den Glucose enthaltenden Ansätzen betrug die Glucosekonzentration 3,4 mg/ml (ca. 18 mMol). Ein Aliquot (1,0 ml) der entsprechenden Zellsuspension (ca.4%ig) wurde bei 38° bzw. 46°C für 30 Min. vorinkubiert und anschließend unter Standard-Bedingungen die DNA-Synthese bestimmt (siehe M 4). (Hier erfolgte keine Glucose-Gabe!)
In Eis gehaltene Zellen dienten als Kontrolle.
Aufgetragen wurden die Mittelwerte mit Standardabweichung (n= 5).

In 90%igem D_2O ist dagegen in allen Fällen der Thymidin-Einbau bei mit Glucose vorinkubierten Zellen erniedrigt (ABB. 13). Eindeutig meßbar ist auch hier der erhöhte Thymidin-Einbau bei Tumorzellen, die in D_2O-Puffer hyperthermiert worden waren. Es kann jedoch nicht erklärt werden, warum der Zusatz von Glucose in D_2O den meßbaren Thymidin-Einbau in die Tumorzellen deutlich erniedrigt.

Aus der Tatsache, daß die DNA-Synthese von Ascites-Tumorzellen durch Glucose in D_2O nicht erhöht wird, kann man vielleicht schließen, daß der aktive Transport von Glucose auf Grund der Lösungsmittelisotopieeffekte von D_2O wesentlich verringert ist. Nach Untersuchungen anderer Autoren ist die Membranpermeabilität in D_2O um ca. 40% verringert (157, 172).

Eine Erklärung im Sinne der Stabilisierung von Thymidin ist bei unserer Versuchsanordnung wohl nicht möglich. Hier war ja die Glucose nur während der Hyperthermie, nicht aber während der eigentlichen Inkubationsperiode anwesend.
Ob D_2O hierbei weiterhin noch hemmend auf proteolytische Enzyme gewirkt hat, läßt sich nicht eindeutig entscheiden.

Unter der Voraussetzung, daß ein für die DNA-Synthese maßgeblicher Parameter der ATP- Spiegel ist, wäre folgende Möglichkeit denkbar:

Bei der Vorinkubation der Tumorzellen wird durch die Gabe von Glucose die Atmung zurückgedrängt (CRABTREE); dabei nimmt die Glykolyse in demselben Maße zu, wie dies dem Energieverlust durch die verminderte Sauerstoff-Aufnahme entspricht.
Die quantitative Untersuchung dieser Vorgänge hat gezeigt (QUASTEL), daß die Summe von Atmung und Glykolyse energetisch konstant ist - gemäß folgender Gleichung:

$$-Q_{O_2} \cdot 2q + Q_M = \text{const.}$$

oder:

$$-Q_{O_2} \cdot 2q\,ATP + Q_M\,ATP = \sum ATP$$

dabei bedeuten: $-Q_{O_2}$ = Sauerstoff-Verbrauch

Q_M = Lactatbildung

q = P/O-Quotient

Da der Umsatz der Glucose in D_2O gegenüber H_2O vermindert ist, müßte die auf diese Weise reduzierte Energiemenge durch Erhöhung der Atmung kompensiert werden.

Normalerweise führt Deuteriumoxid bei den meisten Geweben zu einer Atmungshemmung (147,231,232). ROTHSTEIN et al.(170) fanden aber im Falle von HeLa-Zellen bei respirometrischen Versuchen einen Anstieg des Q_{CO_2} sowie eine Aufhebung des CRABTREE-Effekts in D_2O: In D_2O führte die Gabe von Glucose nicht zu einem Abfall des Sauerstoff-Verbrauchs. (Allerdings wurden diese Versuche mit niedrigen D_2O-Konzentrationen durchgeführt!)

Da nach LISS (234) und QUASTEL (233) der Einbau z.B. von ^{14}C-Glycin bzw. - Leucin in das Protein der Tumorzellen auch ohne Ablauf der aeroben Glykolyse optimal verläuft, kann angenommen werden, daß der Zusatz der Glucose in D_2O in der Vorinkubationsperiode zu einem Abfall der durch aerobe Glykolyse gebildeten Energie geführt hat, die nicht durch die Atmung kompensiert werden konnte (siehe auch 235). Dadurch wurde dann die DNA-Synthese stark reduziert.

Da die Bedeutung der Glucose neben der Erhöhung des ATP-Spiegels aber auch in der Bildung von Stoffwechsel-Zwischenprodukten liegt, die wichtige Bausteine für Zellbestandteile darstellen (Kohlehydratanteil), ist es nicht leicht, festzustellen, welcher dieser beiden Wege stärker durch Deuteriumoxid gehemmt wird.
Vielleicht können weitere Untersuchungen über den Einfluß von D_2O auf Glykolyse bzw.ATP-Spiegel näheren Aufschluß bringen.

Der Einfluß des pH-Wertes bei der Hyperthermie

Die hohe Glykolysekapazität der Tumorzellen führt bei ausreichendem Glucose-Angebot zu einer starken pH-Verschiebung in den sauren Bereich. Nach v.ARDENNE wird dadurch der Wirkungsgrad der Hyperthermie verstärkt (178).
Es war daher interessant, zu klären, ob speziell das gebildete Lactat oder allgemein der saure pH-Wert eines Puffers während der Hyperthermie einen schädigenden Einfluß auf die DNA-Synthese ausübt. Wenn ja, sind die Verhältnisse in D_2O unterschiedlich dazu?

Wir inkubierten die Ascites-Tumorzellen (ATZ) nach der schon bekannten Methode (ABB. 8/ Methodik M 4) bei verschiedenen pH-Werten (ohne Glucose) und bestimmten anschließend die DNA-Synthese.

Die Ergebnisse zeigt ABB. 14.

Zellen, die zur Kontrolle in Eis bei pH 7,4 gehalten worden waren, zeigten sowohl in H_2O-, als auch D_2O-Puffer (90%) die höchsten Thymidin-Einbauraten. Ein deutlicher Unterschied ist bei den Kontrollen zwischen H_2O und D_2O nicht festzustellen.

Bei Zellen, die in H_2O bei 38° vorinkubiert wurden, findet man eine höhere DNA-Synthese mit fallendem pH-Wert:
ATZ, die bei pH 6,5 vorinkubiert worden waren, haben höhere Einbauraten, als diejenigen bei pH 7,0 oder 7,4.
Bei der Hyperthermie-Temperatur 46° sind in H_2O alle Tumorzellen gleich stark geschädigt, während sich nach Hyperthermie in D_2O wieder eine deutlich erhöhte DNA-Synthese messen läßt ($p < 0{,}0025$).

Da bei 46° keine Unterschiede in Abhängigkeit vom pH-Wert festgestellt werden konnten, kann bezweifelt werden, daß allein der saure pH-Wert zur stärkeren Schädigung der Tumorzelle führt.

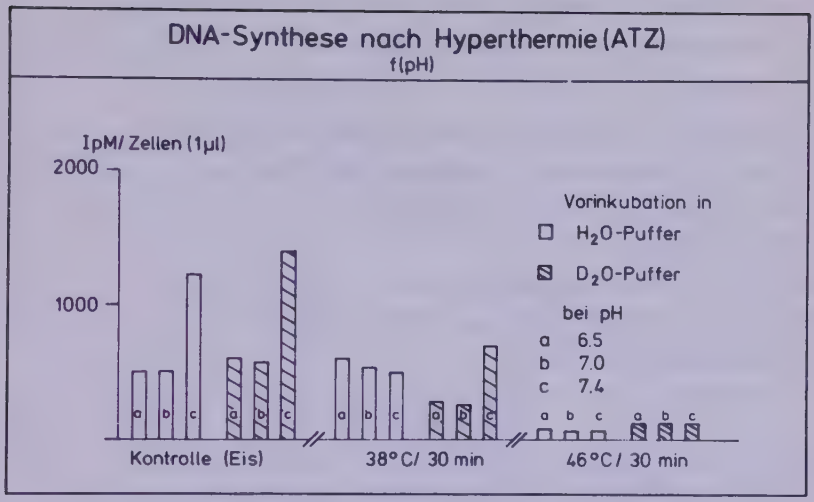


ABBILDUNG 14: DNA-Synthese (ATZ) nach Hyperthermie in Abhängigkeit vom pH-Wert des Puffers

Inkubationsmedium: Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer verschiedener pH-Werte (6,5/7,0/7,4) in H_2O bzw. D_2O (90%)

Ein Aliquot (1,0ml) der jeweiligen Zellsuspension (ca.4%ig) wurde bei 38° bzw. 46°C vorinkubiert und anschließend unter Standard-Bedingungen die DNA-Synthese bestimmt (siehe M 4).
In Eis gehaltene Tumorzellen dienten als Kontrolle.
Aufgetragen wurden Mittelwerte. (n= 2)

Da im allgemeinen höhere H^+-Ionen-Konzentrationen zu einer Verminderung denaturierender Einflüsse zu führen scheinen (siehe Temp.38°), liegt der therapeutische Wert der Hyperthermie von Tumorzellen möglicherweise nicht bei einer pH-Verschiebung durch "Übersäurung".

Unsere Vermutungen stimmen überein mit Untersuchungen von MONDOVI (198), der bei verschiedenen Tumoren auch Hemmung der Thymidin-Einbauraten nach Hyperthermie feststellte, wenn sich der pH-Wert nach Anwendung geeigneter Puffer nicht in den sauren Bereich verschob.
Dabei darf allerdings nicht übersehen werden, daß sich intrazellulärer und extrazellulärer pH-Wert der Tumorzelle um ca. 0,4 Einheiten unterscheiden (238).

Der Einfluß von D_2O auf die Zellstabilität bei Hypothermie

Aus der Literatur ist bekannt, daß Tumorzellen nur gegen Hitze, nicht aber tiefe Temperaturen empfindlich sind.
Wir wollten daher prüfen, ob die DNA-Synthese-Hemmung durch hohe D_2O-Konzentrationen bei niedriger Temperatur eher zu einer stabilisierenden oder schädigenden Wirkung führen würde.

Dies wäre z.B. beim Anlegen von Zellkulturen oder bei einer "Tumorbank" von Bedeutung.

> Wir supendierten die Ascites-Tumorzellen in H_2O-Puffer (pH 7,4) bzw. D_2O-Puffer (90%). Die Zellen wurden in der Kühlkammer (1°C) in Eis gehalten und zu bestimmten Zeiten wurden Proben entnommen und die Thymidin-Einbaurate unter Standard-Bedingungen (38°, 30 Min.) bestimmt.

Die Ergebnisse zeigen ABB. 15 und 15 A.

Schon zu Beginn des Versuchs erkennt man die Hemmung der DNA-Synthese in D_2O-Puffer.

Während jedoch die Thymidin-Einbaurate in H_2O innerhalb von 3 Stunden um ca. 65% fällt, ändert sich der Wert bei D_2O innerhalb 60 Minuten nicht. Nach 3 Stunden in D_2O-Puffer liegt der Wert der DNA-Synthese bei ca. 46% des Ausgangswertes.
Danach sinkt die DNA-Synthese in beiden Fällen nahezu parallel ab.

Nach 9 Stunden in H_2O bei ca. 1°C läßt sich noch eine Einbaurate von 22% des Ausgangswertes messen, gegenüber 35% in D_2O.

Die biologischen Halbwertszeiten liegen bei : (ABB. 15A)

H_2O	ca. 105 Min.
D_2O	ca. 200 Min.

In beiden Fällen konnten die 9 Stunden aufbewahrten Tumorzellen mit Erfolg auf Mäuse überimpft werden.

Die Ergebnisse zeigen, daß es möglich ist, Zellen unter den genannten Bedingungen zu konservieren.

Nach Reduzierung der D_2O-Konzentration und Wahl eines geeigneten Puffers könnte man möglicherweise ein Medium zur Stabilisierung von Zellen oder Geweben herstellen, mit dem die Lebensdauer wegen der Hemmung enzymatischer Prozesse (damit auch proteolytischer Einflüsse) in Deuteriumoxid verlängert werden könnte.

Zusammenfassung

Es wurde der Einfluß von Deuteriumoxid auf die DNA-Synthese von Ascites-Tumorzellen (Ehrlich-ATZ) nach Hyperthermie untersucht.

Schweres Wasser ruft bei Raumtemperatur konzentrationsabhängig eine Hemmung der DNA-Synthese gegenüber H_2O hervor.
Nach Anwendung einer geeigneten Versuchsanordnung (Entkopplung von Schädigungs- und Meßperiode) läßt sich zeigen, daß nach Hyperthermie (46°/ D_2O) Ascites-Tumorzellen eine im Vergleich zu H_2O erhöhte DNA-Synthese haben, also weniger stark geschädigt sind.

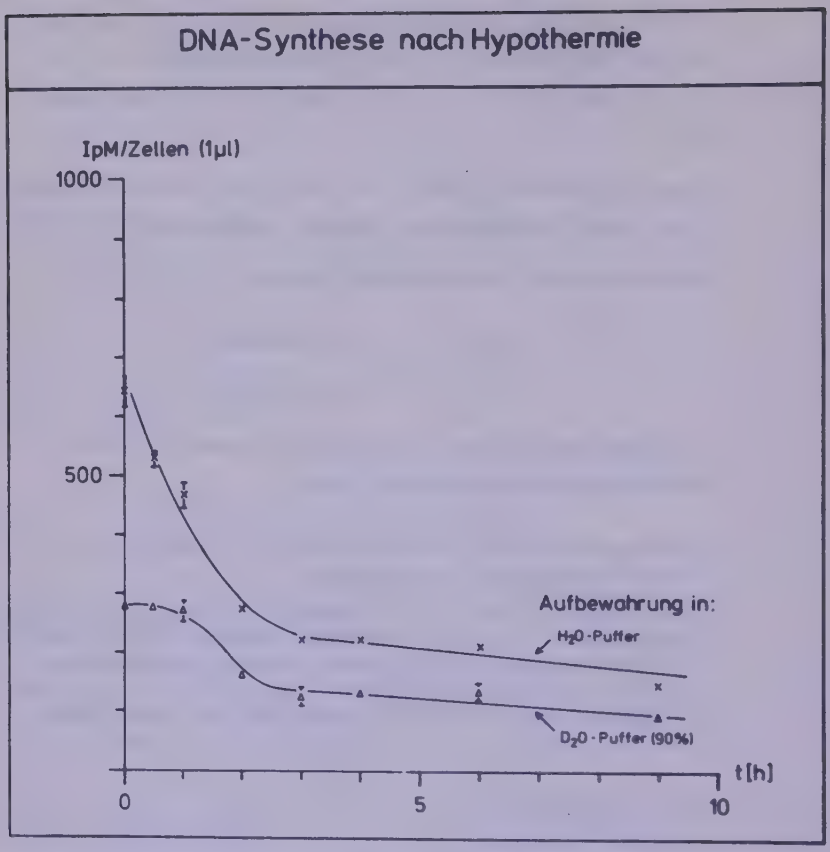


ABBILDUNG 15: DNA-Synthese (ATZ) nach Hypothermie in Abhängigkeit von der Aufbewahrungsdauer

Inkubationsmedium: Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer , pH 7,4 in H_2O // D_2O

Die Zellsuspension (ca.4%ig) wurde bei ca.1°C gehalten und zu bestimmten Zeiten ein Aliquot (1,0 ml) entnommen und sofort unter Standard-Bedingungen die DNA-Synthese bestimmt (siehe M 4).

Aufgetragen wurden die Mittelwerte (n= 2).

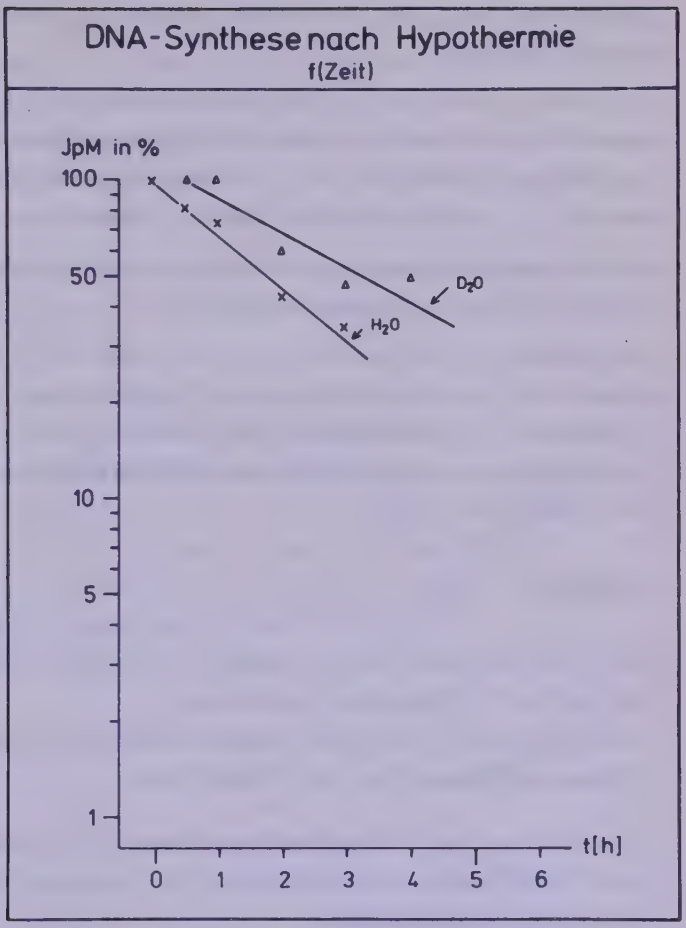


ABBILDUNG 15 A: Halblogarithmische Darstellung der DNA-Synthese (ATZ) nach Hypothermie zur Ermittlung der HWZ

Versuchsbedingungen und Werte siehe Abb. 15.

Die DNA-Synthese wird jedoch durch Hyperthermie stark reduziert. Die Anwendung niedriger D_2O-Konzentrationen hat nahezu den gleichen "Schutzeffekt" wie 90%iges Deuteriumoxid, während die Toxizität dadurch verringert wird.

Während die Glucose-Gabe in der Hyperthermieperiode in H_2O-Puffer zu einer erhöhten anschließenden DNA-Synthese (also Verminderung der Schädigung) führt, ist dieser Effekt in D_2O umgekehrt : es resultieren niedrigere Thymidin-Einbauraten.

Eine Variation des pH-Wertes in der Hyperthermieperiode hat keinen deutlichen Einfluß auf den Schädigungsgrad.

Nach Aufbewahrung der Tumorzellen in D_2O-Puffer bei ca. $1^{\circ}C$ (Eis) ist zwar die DNA-Synthese im Vergleich zu H_2O über längere Zeit vermindert, doch erscheinen die Zellen relativ stabil.
In beiden Fällen sind die Tumorzellen nach 9 stündiger Hypothermie noch erfolgreich überimpfbar.

Diskussion

Die von uns gefundenen Ergebnisse entsprechen den schon im Kapitel ENZYME (3.1.1.) aufgeführten Ergebnissen.
Daher erscheint es mir überflüssig, nochmals alle Gründe für die Wirkungen von Deuteriumoxid genauer aufzuführen:

Im wesentlichen liegt die Begründung im Isotopenaustausch zwischen H und D in den Makromolekülen. Dieser ist, wie schon berichtet, pH- und/oder temperaturabhängig.

Daher führt die Änderung dieser physikalischen Parameter zu einer schnellen Deuterierung der Makromoleküle der Zelle und damit zu einer Konformationsveränderung.
Während bei Raum- bzw. Körpertemperatur die Deuterierung auf Grund stärkerer Bindungsfestigkeit zu verminderter Reaktionsgeschwindigkeit führt, bedeutet sie bei hoher (Hyperthermie-)

Temperatur eine Stabilisierung der Konformation der Makromoleküle.

Da dem Wasser auf molekularem Sektor (z.B. bei der Reduplikation der DNA) manchmal die Hauptrolle zugeschrieben wird - Änderungen der isotopen Zusammensetzung des Lösungsmittels führen wahrscheinlich zu Synchronisationsstörungen-, ist es auch möglich, daß strukturelle Veränderungen der Makromoleküle (mit den damit verbundenen Massenänderungen etc.) die Ursache für die durch D_2O hervorgerufenen Effekte sein können.

In der Literatur werden sogar Veränderungen der ferroelektrischen Eigenschaften von DNA und RNA durch Deuteriumoxid diskutiert (80).

Die aus der Literatur bekannte Erhöhung der Denaturierungstemperatur verschiedener Proteine (2,3,74,96,97) in D_2O von ca. 4^oC gegenüber Wasser wird in unserem Fall bei einem biologischen System nicht erreicht.
Ein Grund dafür ist möglicherweise die Komplexität der biochemischen Abläufe der Tumorzellen mit den dadurch auftretenden vielfachen Beeinflussungsmöglichkeiten von D_2O.

b) ATP-BILANZ

Die Wirkung der Hyperthermie auf verschiedene Parameter des Stoffwechsels der Tumorzellen ist vielfach beschrieben worden (177,180-202). Trotzdem sind die Kenntnisse über Angriffspunkt und Wirkungsmechanismus noch lückenhaft. Eine Zusammenfassung der Theorien geben ROSE (239) und DROST-HANSEN (240).

Da wir nachweisen konnten, daß die Temperaturschädigung von Tumorzellen im Bezug auf ihre DNA-Synthese in Deuteriumoxid vermindert wird, wollten wir folgende Fragen klären:

1) Besteht ein Zusammenhang zwischen der DNA-Synthese und dem ATP-Spiegel bei Tumorzellen ?
2) Wird der ATP-Spiegel der Tumorzellen nach Hyperthermie gesenkt?
3) Wie beeinflußt D_2O den ATP-Spiegel bei ATZ?

Die Ascites-Tumorzellen wurden unterschiedliche Zeit bei 38° bzw. 46° in H_2O- bzw. D_2O-Puffer (90%) vorinkubiert und anschließend nach Aufarbeitung sofort der ATP-Gehalt der Zellen bestimmt.

Die genaue Methodik ist dem methodischen Teil (M 6) zu entnehmen!

Ergebnisse:

Bei orientierenden Vorversuchen in H_2O-Puffer (Krebs-Ringer-PO_4) konnten wir feststellen, daß der ATP-Gehalt der Ascites-Tumorzellen schon innerhalb der ersten 5 - 10 Minuten auf ca. 50% des Ausgangswertes (38°) absinkt, wenn die Zellen bei $46^{\circ}C$ hyperthermiert werden.

Sind die Zellen jedoch vor der Hyperthermiephase mit Sauerstoff begast worden (10 Min.), so sind deutlich erhöhte ATP-Werte festzustellen.

Die Zugabe von 3,4 mg/ml Glucose führt bei 46° zu einem steilen Anstieg des ATP-Spiegels innerhalb 5 Minuten: dieser ca. 5-fach erhöhte Wert bleibt dann über nahezu 60 Minuten bei 46° erhalten.

Siehe ABB. 34 im Methodik-Teil (M 6)!

Im Hauptversuch wurden die Tumorzellen gemäß der schon beschriebenen Methode in H_2O bzw. D_2O inkubiert und der ATP-Gehalt bestimmt.
In diesem Fall enthielten die Zellen keine Glucose und wurden nicht vorher mit Sauerstoff begast.

Die Ergebnisse zeigt ABB. 16

Es ist deutlich zu erkennen, daß in beiden Fällen der ATP-Spiegel bei 46° schneller sinkt als bei 38°.
In den in Deuteriumoxid inkubierten Zellen liegt der ATP-Spiegel der Kontrolle schon zu Beginn niedriger, als bei den in H_2O inkubierten Zellen. Darüberhinaus führt die Inkubation in D_2O zu einem schnelleren ATP-Verlust:
Die HWZ (Zeit für das Absinken des ATP-Spiegels auf 50% der Kontrolle von 38°) liegt bei

H_2O, 46°	ca. 10 Min.
D_2O, 46°	ca. 6 Min.

Die stärkste Beeinflussung tritt in den ersten 5-10 Minuten auf, dann nähern sich die Werte einem Plateau.
Als Ergebnis kann man feststellen, daß der ATP-Spiegel der Ascites-Tumorzellen durch 90%iges D_2O eher gesenkt wird. Eine Stabilisierung gegen Hitzeschädigung, wie sie bei der DNA-Synthese meßbar ist, tritt nicht auf.
Einem starken Absinken des ATP-Spiegels wirken jedoch die vorherige Begasung mit Sauerstoff oder besonders die Zufuhr von Glucose entgegen.

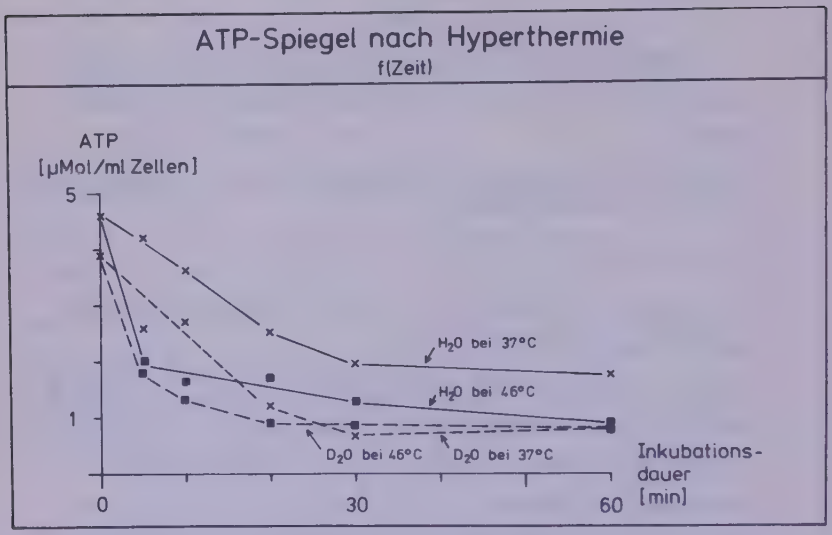


ABBILDUNG 16: ATP-Spiegel (ATZ) nach Hyperthermie in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bei 37° bzw. 46°C.

Inkubationsmedium: Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4 in H_2O // D_2O

Ein Aliquot (1,0 ml) der jeweiligen Zellsuspension (ca.4%ig) wurde für die angegebene Zeit bei 38° bzw. 46°C inkubiert und anschließend sofort die ATP-Konzentration bestimmt (siehe M 6).

Aufgetragen sind die Mittelwerte (n= 3).

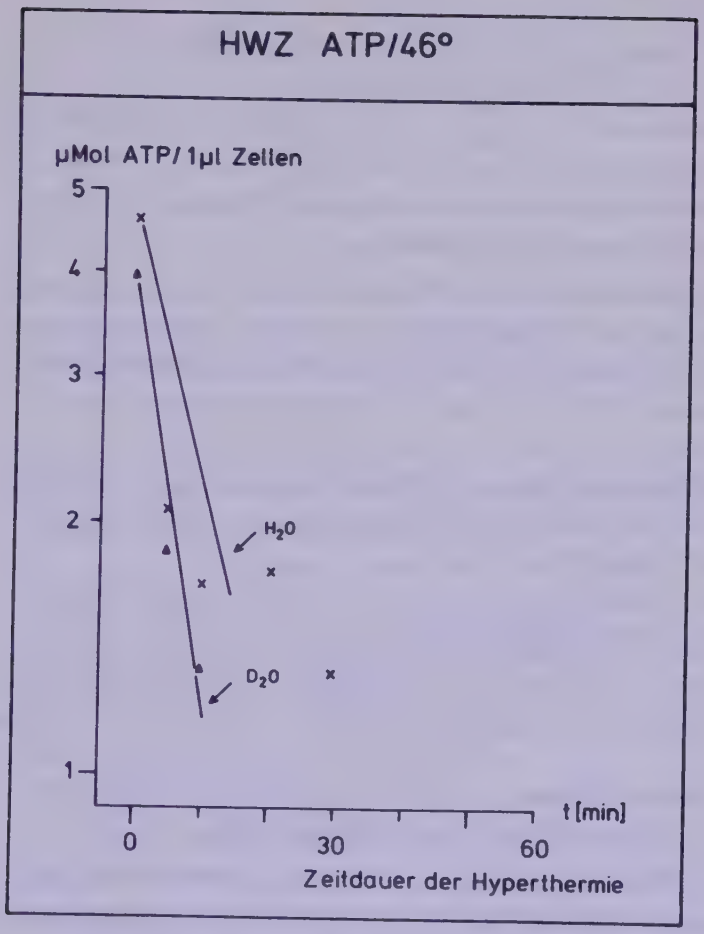


ABBILDUNG 16 A: Halblogarithmische Darstellung der Ergebnisse aus Abb. 16 zur Ermittlung der HWZ

Werte und Versuchsbedingungen siehe Abb. 16

Diskussion

Allgemeines über den ATP-Spiegel:

Die Erhöhung des ATP-Spiegels von Zellen durch stärkere Atmung oder Glucose-Abbau ist seit langem bekannt.
QUASTEL und BICKIS (241) nehmen sogar eine strenge Kopplung von Atmung und Glykolyse an (siehe auch voriges Kapitel!), über die Gleichwertigkeit von glykolytischem und Atmungs-ATP bestehen jedoch z.T. erhebliche Meinungsunterschiede.

Nach verschiedenen Autoren (242-244) ist eine Tumorzellvermehrung auch ohne aerobe Glykolyse möglich. Insofern wird die Auffassung LETTRE's bestätigt, daß die aerobe Glykolyse, abgesehen von der Bildung wichtiger Zwischenprodukte, energetisch überflüssig sei (245).
Nach WARBURG (246) dient jedoch die aerobe Glykolyse dem Ausgleich eines Energiedefizits, hervorgerufen durch die geschädigte Atmung der Tumorzellen.

Bei Abwesenheit von Glucose oder Hemmung der Glykolyse lassen nämlich verschiedene Stoffwechselleistungen nach und die Zellen sterben unter Umständen sogar (235,247,248). Es wurde auch in Abwesenheit von Glucose ein allmählicher Verlust an ATP und eine Verminderung des Gesamtnucleotidgehaltes von Tumorzellen beobachtet und mit der geschädigten Atmung der Tumorzellen bergündet (247).

Weder die Atmung allein, noch allein die Glykolyse können also den ATP-Spiegel der Zellen auf normaler Höhe halten.

Die Rolle der Glucose darf aber, wie schon erwähnt, nicht nur unter energetischen Gesichtspunkten betrachtet werden. Die Metabolisierung der Glucose zu Zwischenprodukten der Atmung und Glykolyse, insbesondere die Biosynthese der Ribose, spielt offensichtlich eine bedeutende Rolle.

Einfluß der Hyperthermie auf den ATP-Spiegel

Wie aber verändert der Einfluß hoher Temperaturen diese Verhältnisse? Welche Bedeutung hat überhaupt ATP für die DNA-Synthese der Zellen?

CAVALIERE (209) fand nach Hyperthermie von Ascites-Tumorzellen bei 44^{o} innerhalb der ersten drei Stunden keinen wesentlichen Unterschied in der Sauerstoff-Aufnahme gegenüber 38^{o}. Erst nach dieser Zeit war die Atmung verringert. Wurde jedoch Glucose zugefügt, dann war die Sauerstoff-Aufnahme bei 44^{o} höher, während die anaerobe Glykolyse nur geringfügig beeinflußt wurde.

Unsere Untersuchungen in Abwesenheit von Glucose unter Anwendung hoher Temperaturen bestätigen den Zusammenhang zwischen Energiegewinnung und Glykolyse, denn offensichtlich kann die Tumorzelle die durch Reduzierung der Glykolyse auftretende Differenz an ATP nicht schnell genug ausgleichen, zumal unter obigen Bedingungen die Atmung nicht stimuliert wird.

Allerdings ist nicht geklärt, ob die erniedrigten ATP-Werte unter solch ungünstigen Bedingungen Ausdruck einer verminderten ATP-Produktion sind, oder durch gesteigerten ATP-Verbrauch bzw. Stimulierung von Zell-ATPasen hervorgerufen werden.
Auch darf nicht übersehen werden, daß der niedrige ATP-Spiegel keine Auskunft über das Energiepotential der Zelle gibt, das ja vom Verhältnis ATP/ ADP abhängt.

Der Einfluß von Deuteriumoxid

Auf Grund der Verminderung von Stoffwechselleistungen in D_2O erscheint der niedrigere ATP-Spiegel der in D_2O inkubierten ATZ erklärlich: Da die Zellen bei thermischer Belastung (Hyperthermie) auf erhöhten Umsatz angewiesen sind, um ihre normalen Stoffwechselleistungen aufrechterhalten zu können, dieser aber in D_2O vermindert wird, läßt sich ein schneller abfallender ATP-Spiegel erwarten.

Nun wird andererseits der Sauerstoff-Verbrauch von Geweben oder isolierten Mitochondrien usw. in hochkonzentriertem D_2O verringert, während die Phosphorylierung nicht beeinflußt wird. Die Folge ist

eine Erhöhung des P/O-Quotienten (251).

Unter der Voraussetzung der von QUASTEL angenommenen Energiekonstanz von Atmungs- und Glykolyse-ATP kann man daher auch erklären, warum die ATP-Menge in D_2O niedriger ist:

$$-Q_{O_2} \cdot 2\,q\ \text{ATP} + Q_{Lac}\ \text{ATP} = \sum \text{ATP}$$

ATMUNG GLYKOLYSE

q = P/O-Quotient ("oxidative ATP-Produktion")

Da einerseits der Sauerstoff-Verbrauch (Atmung) in D_2O reduziert ist, die Glykolyse jedoch infolge Glucose-Mangels bzw. ebenfalls reduzierten Umsatzes nicht kompensatorisch eingreifen kann, verarmen die Zellen an ATP.
Dies geschieht umso schneller, je länger bzw. höher die thermische Belastung der Zellen ist.
Im Falle von D_2O können allerdings weitere Einflüsse hinzukommen, z.B. eine Beeinflussung der Membranen.

Aus unseren Ergebnissen kann die wichtige Aussage getroffen werden, daß ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen ATP-Spiegel und DNA-Synthese nach Hyperthermie von Tumorzellen nicht gegeben ist.

Ein rascherer ATP-Abfall in D_2O nach Hyperthermie von Ascites-Tumorzellen führt nicht zu einer ebenfalls stärkeren Schädigung der DNA-Synthese, sondern hat im Gegensatz zu Wasser eine erhöhte Thymidin-Einbaurate zur Folge.

Diese Interpretation stünde im Einklang mit Befunden anderer Autoren (249), die fanden, daß die Vermehrung der Tumorzellen im Falle von Sauerstoffmangel gehemmt wird, auch wenn die Glykolyse genügend ATP liefert.
Die DNA-Synthese scheint dagegen eng mit der Atmung verknüpft zu sein (250).

Die Befunde von ROTHSTEIN u.a. (170) an HeLa-Zellen in D_2O können nur von geringer Bedeutung sein, weil sie mit nur 50%igem Deuteriumoxid durchgeführt wurden. Aus anderen Untersuchungen (u.a. 251) ist jedoch bekannt, daß Inhibierungen der berichteten Art erst bei Konzentrationen ab ca. 70% D_2O auftreten.

c) Aerobe Glykolyse

Tumorzellen unterscheiden sich von Normalgewebe insbesondere durch ihre Fähigkeit, Glucose auch unter aeroben Bedingungen zu Milchsäure abbauen zu können (WARBURG 246).

Als Grund für diese hohe Glykolysekapazität nahm WARBURG eine geschädigte Atmung an, wodurch die Zelle auf die glykolytische Energiegewinnung angewiesen sei.
Über diese Zusammenhänge bestehen jedoch z.T. erhebliche Meinungsunterschiede: Während eine Gruppe annimmt, daß die gesenkte und geschädigte Tumoratmung die größte Bedeutung für das Tumorwachstum hat, wird dies von anderen bestritten (252 - 254). Eine endgültige Klärung gibt es heute nicht.

Uns interessierte hier vor allem die Bedeutung der Glykolyse für die Lebensfähigkeit der Tumorzellen.
Nachdem wir in früheren Versuchen die Beeinflussung der DNA-Synthese und des ATP-Spiegels der Ascites-Tumorzellen nach Hyperthermie untersucht hatten, wollten wir nun folgende Fragen klären:

1. Wie beeinflußt die Hyperthermie das Glykolyse-Verhalten der Ascites-Tumorzellen ?
2. Wie wirkt sich die Anwesenheit von D_2O auf die Glykolysekapazität der Tumorzellen aus?

Allgemeine Methodik:

Methodisch hielten wir uns an das bekannte Verfahren (ABB. 8). Die Zellen wurden (ohne Glucose) bei verschiedenen Temperaturen in H_2O bzw. D_2O vorinkubiert und danach (nach Abzentrifugation) durch Zugabe von Glucose in frischem H_2O-Puffer die earobe Glykolyse gestartet.
Als Maß der Schädigung nahmen wir die Abnahme der Glykolysekapazität der Tumorzellen- das als Differenz zur Kontrolle aerob gebildete Lactat.
Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe des optischen Tests nach HOHORST (276). Siehe METHODIK - M 7)!

Der Einfluß der Temperatur auf die aerobe Glykolyse der Tumorzellen

Die Tumorzellen wurden gemäß der schon beschriebenen Versuchsanordnung in Krebs-Ringer-PO_4-Puffer (pH 7,4) in H_2O bzw. D_2O (90%) jeweils für konstant 30 Minuten vorinkubiert und anschließend ihre Glykolysekapazität bestimmt (M 7).
Als Kontrolle dienten Tumorzellen, die während dieser Zeit in Eis gehalten wurden.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind aus ABB. 17 zu ersehen:

Tumorzellen (Ehrlich-ATZ), die bei 38° in H_2O-Puffer vorinkubiert wurden, haben eine aerobe Glykolysekapazität von ca. 11 mg Lactat/1 g Zellen(F.G.) • 30 Minuten.
Der Wert für in D_2O vorinkubierte Tumorzellen liegt bei etwa 9 mg/1 g Zellen • 30 Minuten.(ca. 82%).

Mit zunehmender Hyperthermie-Temperatur nimmt auch der Grad der Zellschädigung zu: Dies äußert sich in einem starken Absinken der aeroben Glykolysekapazität.
Die gebildeten Lactatmengen der in D_2O hyperthermierten Tumorzellen liegen durchweg unter den entsprechenden H_2O-Werten. Erst bei ca. 45° liegen die D_2O-Werte höher als die H_2O-Werte.

Eine ähnliche Aussage wie bei der DNA-Synthese (3.2.3. a) im Sinne eines "Schutzeffektes" kann hier für Deuteriumoxid nicht getroffen werden.

Die biologischen Halbwertstemperaturen (Temperaturen zur Erniedrigung der Glykolyse auf die Hälfte der 38°-Werte) unterscheiden sich praktisch nicht.
Weiteren Aufschluß sollte der folgende Versuch erbringen, in dem die Ascites-Tumorzellen bei 38° und 46° unterschiedliche Zeit vorinkubiert wurden.

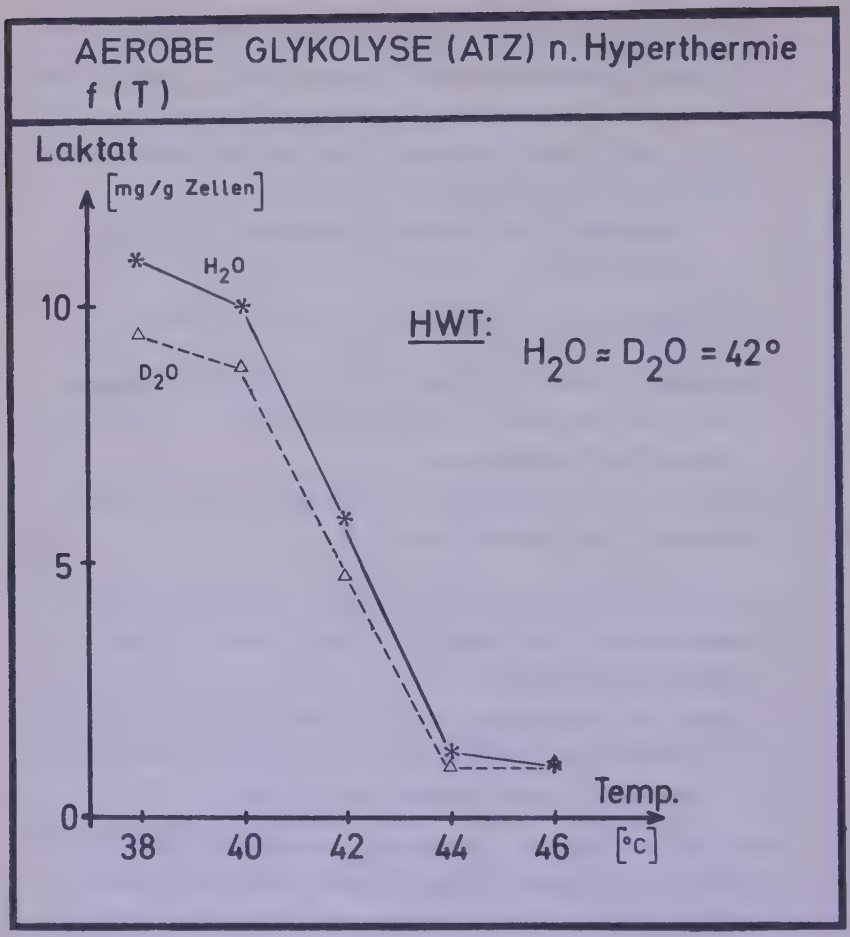


ABBILDUNG 17: Aerobe Glykolysekapazität (ATZ) nach Hyperthermie in Abhängigkeit von der Temperatur

Inkubationsmedium: K-R-Phosphat-Puffer, pH 7,4 in H_2O bzw. D_2O (90%)
Ein Aliquot (1,0 ml) der jeweiligen Zellsuspension (ca. 4%ig) wurde für 30 Minuten bei der auf der Abszisse angegebenen Zeit vorinkubiert und anschließend unter Standard-Bedingungen die aerobe Glykolysekapazität bestimmt (siehe M 7).
Aufgetragen sind die Mittelwerte der Versuche (n= 3).
HWT ≙ graphisch ermittelte Halbwertstemperatur

Der Einfluß der Inkubationsdauer auf die Glykolysekapazität

Aus ABB. 18 kann man ersehen, daß Tumorzellen, die bei 38°C in H_2O-Puffer ohne Glucose vorinkubiert worden waren, mit zunehmender Inkubationsdauer zunächst erhöhte Glykolysekapazität zeigen. Nach längerer Vorinkubation über 30 Minuten fallen die Werte wieder ab.
Die Vorinkubation der Zellen in D_2O-Puffer ergibt ein ähnliches Bild, nur liegen hier die Werte etwas höher.

Werden dagegen die Tumorzellen bei 46°C hyperthermiert, so fallen die Werte rasch ab. Der hohe Schädigungsgrad der Zellen ist offensichtlich (ABB. 19).

Die in D_2O hyperthermierten Zellen unterscheiden sich nur in der Anfangsphase durch einen schnelleren Abfall der Werte gegenüber den H_2O-Werten. Insgesamt scheint jedoch die Zellschädigung (gemessen an ihrer aeroben Glykolyse) ähnlich zu sein.

Während die Vorinkubation der Ascites-Tumorzellen bei 38°C innerhalb 30 Minuten zu einer anschließend erhöhten Glykolyse führt ("Aktivierung"), werden die Zellen bei 46°C stark geschädigt:

Für D_2O bestehen zwei Interpretationsmöglichkeiten-

Die Ursache liegt evt. in der unterschiedlichen Deuterierungsgeschwindigkeit bei 38° bzw. 46°. Erst nach längerer Inkubationsdauer bei 38°, aber schon nach kurzer Einwirkung bei 46° führt der Isotopenaustausch zu einer Enzymhemmung. Insgesamt resultiert dann eine geringere Glykolyse als in Wasser.

Es wäre aber auch denkbar, daß ein aus der Literatur bekannter Effekt des Deuteriumoxids wirksam würde:

Die Hemmung der Atmung durch D_2O bei 38° hätte danach einen kompensatorischen Anstieg der Glykolyse zur Folge.
Bei 46° potenzieren sich dagegen der denaturierende Einfluß der Hyperthermie auf die Atmung der Zellen (255) mit dem reduzierenden Einfluß von D_2O und verstärkter Deuterierung von Substraten und Enzymen.

Insgesamt stellt man dann eine stärkere Hemmung der Glykolyse als bei Wasser fest.

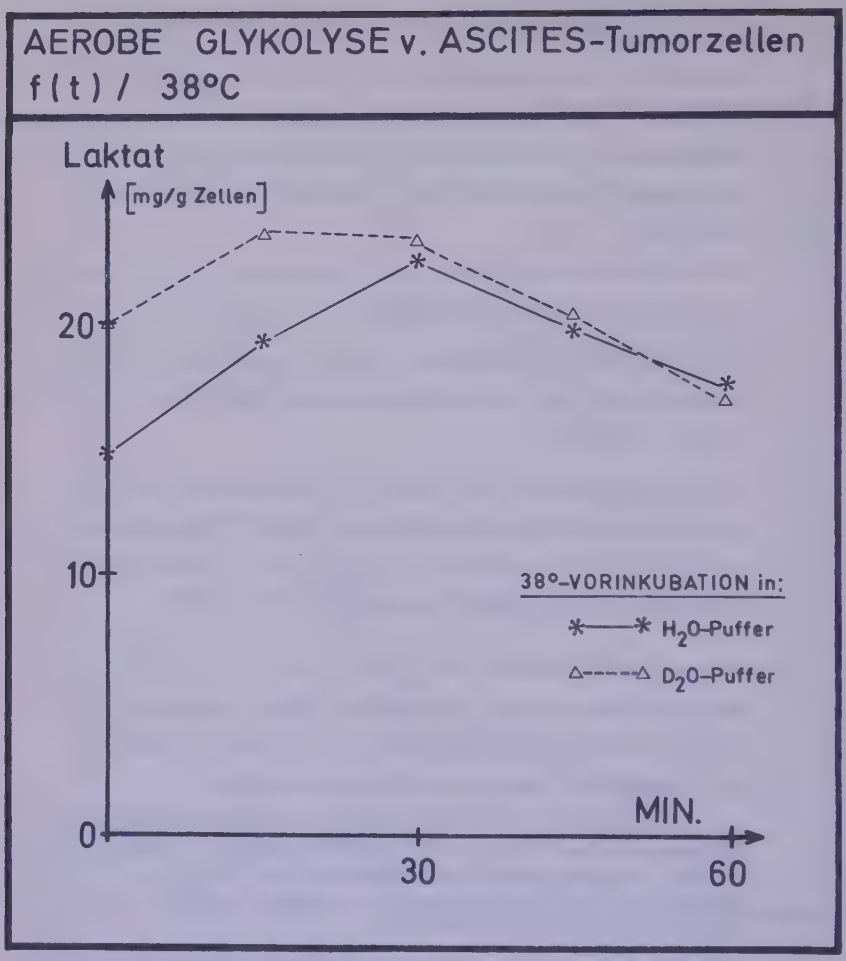


ABBILDUNG 18: Aerobe Glykolysekapazität (ATZ) nach Hyperthermie in Abhängigkeit von der Vorinkubationsdauer bei 38°C

Inkubationsmedium: wie bei Abb. 17 angegeben
Jeweils ein Aliquot (1,0 ml) der entsprechenden Zellsuspension (ca.4%ig) wurde bei 38°C für die in der Abszisse angegebene Zeit vorinkubiert und anschließend sofort unter Standard-Bedingungen die aerobe Glykolysekapazität bestimmt (siehe M 7).
Als Vergleich dienten während der 30 Min.-Vorinkubation in Eis gehaltene Zellen (0-Wert der Abszisse).

(n= 3)

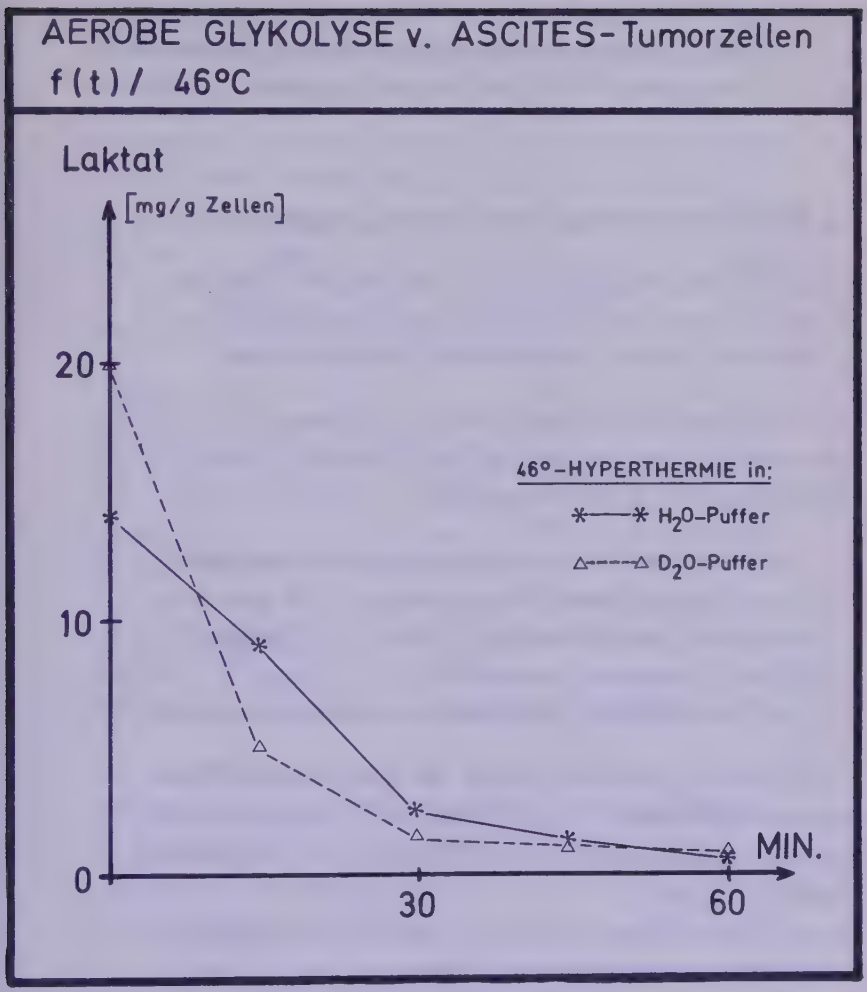


ABBILDUNG 19: Aerobe Glykolysekapazität (ATZ) nach Hyperthermie in Abhängigkeit von der Vorinkubationsdauer bei 46°C

Konzentrationen und Versuchsdurchführung entsprechen Abb. 18, jedoch wurden die Zellen bei 46°C vorinkubiert.

(n= 3)
Die graphisch ermittelten HWZ betragen in :

H_2O ca. 13 Min.

D_2O ca. 8 Min.

Die "Aktivierung" der Glykolysekapazität nach kurzer Vorinkubation in H_2O bei 38°C ist möglicherweise auf Veränderungen der Membranen zurückzuführen, wodurch sich enzymatische Prozesse besser abspielen können. Eine eindeutige Erklärung können wir nicht geben.

Der Einfluß des pH-Wertes auf die Glykolyse von Tumorzellen

In den bisherigen Versuchen war die Vorinkubation der Tumorzellen bei pH 7,4 erfolgt. Auf die Problematik der Vergleichbarkeit von pH und pD ist in einem früheren Kapitel hingewiesen worden.

Uns interessierte, ob die Verschiebung des pH-Wertes in der Hyperthermie-Periode einen wesentlichen Einfluß auf die aerobe Glykolysekapazität der Zellen haben würde.

> In dem folgenden Experiment wurden die Tumorzellen jeweils in H_2O- bzw. D_2O-Puffer der pH-Werte 6,5/ 7,0 und 7,4 vorinkubiert. Nach Aufarbeitung wurde die Glykolysekapazität bei pH 7,4 bestimmt (Methodik M 7).
> Als Kontrolle dienten in Eis gehaltene (ungeschädigte) Zellen.

Wir stellten fest, daß der pH-Wert bei den in Eis gehaltenen Zellen kaum eine Rolle spielt. Lediglich bei den in D_2O gehaltenen Zellen zeichnet sich eine Tendenz zu stärkerer Glykolyse mit zunehmendem pH-Wert (7,4) ab.
Werden die Tumorzellen jedoch bei 38° bzw. 46°C vorinkubiert, so nimmt die Glykolysekapazität mit fallendem pH-Wert zu: Zellen, die z.B. bei 38° in pH 6,5 vorinkubiert wurden, zeigen anschließend eine deutlich höhere Glykolyse, als solche, die in pH 7,4 vorinkubiert worden waren.
Die gleiche Tendenz besteht bei 46° mit deutlicher Reduzierung der aeroben Glykolysekapazität der Ascites-Tumorzellen.
Es zeigt sich erneut, daß D_2O keine Verminderung der Hitzeschädigung

im Bezug auf die aerobe Glykolysekapazität der Tumorzellen bringt.

Da eine drastische Veränderung der Glykolysekapazität durch pH-Wert-Änderung in der Vorinkubationsperiode nicht auftrat, verfolgten wir das Problem nicht weiter.

Interessante Unterschiede erhält man jedoch, wenn die eigentliche Glykolyse bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt wird.
Legt man die durchschnittliche Glykolyserate bei pH 7,4 mit 100% zugrunde, so ergeben sich bei pH 7,0 nur noch ca. 80% und bei pH 6,5 nur noch ca. 49% des Vergleichswertes.
Hier führt ein sinkender pH-Wert zu reduzierter Glykolyse.

Schon geringe pH-Änderungen (z.B. durch Störungen der Puffer-Kapazität der Zellen) führen zu unterschiedlichem Verhalten der Zellen und damit verschiedenen Ergebnissen.
Das Gleiche gilt für Veränderungen der Ionenkonzentration bzw. Ionenzusammensetzung:

Nach eigenen Untersuchungen ruft z.B. Ca^{2+}-haltiger Tyrode-Puffer völlig andere Glykolysewerte hervor.

Man muß daher in Betracht ziehen, daß in D_2O-Puffern wegen der verminderten H^+-Ionen-Konzentration und verminderten Ionenbeweglichkeit andere Verhältnisse herrschen.
Folglich sind Vergleiche zwischen H_2O und D_2O-Medien problematisch, insbesondere, wenn hohe D_2O-Konzentrationen verwendet werden.

Noch ein weiterer Punkt erschwert die Beurteilung der Experimente: Während der Versuche war uns aufgefallen, daß die Kontrollwerte der Glykolysekapazität nicht vorbehandelter Tumorzellen stark schwankten. Eine mögliche Erklärung scheint im unterschiedlichen Alter der Tumorzellen zu liegen.

Der Einfluß des Inokulum-Alters der Tumorzellen

Wir bestimmten unter Standard-Bedingungen die Glykolysekapazität der Tumorzellen in Abhängigkeit von ihrem Inokulum-Alter.

Dabei konnten wir feststellen, daß die Glykolysekapazität mit dem

Inokulumalter zunimmt. (ABB. 20)

Bei 8 Tage alten Ascites-Tumorzellen findet man eine aerobe Glykolysekapazität von ca. 10 mg Lactat/ g · 30 Minuten. Dieser Wert nimmt in weiteren 6 Tagen um mehr als das Doppelte zu. Da im allgemeinen auch die Zahl der anfärbbaren (=toten) Zellen zunimmt, ist dieser Effekt umso überraschender, da für die Glykolyse ja nur die lebenden Zellen verantwortlich sind (228).

Eine daraus resultierende Frage wäre, ob die Tumorzellen auch abhängig von ihrem Inokulumalter unterschiedlich Hyperthermieempfindlich sind. Wir konnten dies Problem hier nicht klären.

Besonders wichtig scheint zu sein, zu vergleichenden Experimenten nur Zellen gleichen Alters (z.B. 7 Tage) zu verwenden und neben der Bestimmung der Zellkonzentration ("Ascitocrit"), die allein recht unsicher ist, noch eine Bestimmung der Gesamtzahl und der anfärbbaren Zellen durchzuführen.

Eine weitere, möglicherweise mit obigen Ergebnissen im Zusammenhang stehende Beobachtung (Anstieg der Osmolarität des Serums der Ascites-Tumorzellen), findet sich im methodischen Teil (M 8).

Zusammenfassung / Diskussion

Wir konnten nachweisen, daß die Hyperthermie von Ascites-Tumorzellen bei 46°C nach 30 Minuten zu einer über 90%igen Hemmung der aeroben Glykolyse führt.
Der Grad der Schädigung läßt sich durch Anwendung von 90%igem D_2O in der Hyperthermiephase nicht reduzieren. Bei Körpertemperatur (38°C) zeigt sich der bekannte hemmende Einfluß von D_2O auf die Glykolysefähigkeit der Tumorzellen.

Die Ergebnisse bestätigen, daß die Anwendung hoher Temperaturen zu einer weitreichenden Schädigung der Tumorzelle führt.
Über die Bedeutung der Glykolysehemmung, insbesondere unter dem

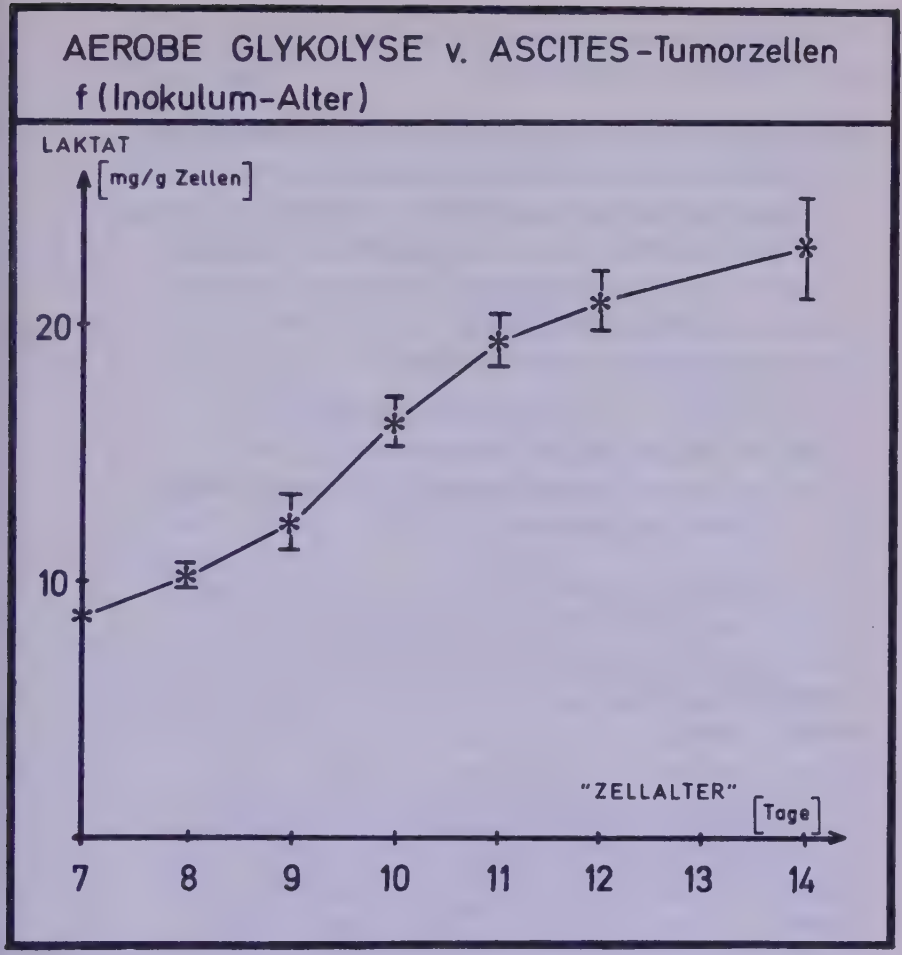


ABBILDUNG 20: Aerobe Glykolysekapazität (ATZ) in Abhängigkeit von ihrem Inokulum-Alter

Inkubationsmedium: K-R-Phosphat-Puffer, pH 7,4 in H_2O, enthaltend 3,4 mg/ml Glucose (ca. 18 mMol)

Ein Aliquot (1,0 ml) der ca. 4%igen Zellsuspension von Tumorzellen unterschiedlichen Alters (Abszisse) wurde unter Standard-Bedingungen (38°, 30 Min.) inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung des gebildeten Laktats nach HOHORST (siehe auch M 7).

Aufgetragen wurden die Mittelwerte mit Standardabweichung (n= 3).

Gesichtspunkt der energetischen Versorgung der Tumorzelle bestehen jedoch noch Unklarheiten.

Während CAVALIERE und Mitarbeiter (209) keinen Einfluß einer 44°C-Hyperthermie auf die anaerobe Glykolyse von Ascites-Tumorzellen fanden, liegen entgegengesetzte Befunde von v.ARDENNE vor (256). Es scheint jedoch, daß dies z.T. mit unterschiedlichen Versuchsbedingungen erklärbar ist: v.ARDENNE fand eine von der Glucose-Konzentration abhängige Zunahme der anaeroben Glykolyse mit erhöhter Temperatur.

Da die Hyperthermie von uns ohne Glucose durchgeführt wurde, ist möglicherweise der Grad der Schädigung höher, als bei Anwesenheit von Glucose. Das hat wahrscheinlich energetische Gründe (siehe dazu auch 178a, 249a).

Nach Untersuchungen anderer Autoren ist die Lebensfähigkeit, die Atmung sowie der Pasteur-Effekt von Ascites-Tumorzellen wesentlich empfindlicher als die Glykolyse (257). Allerdings wird auch hier hervorgehoben, daß die Abwesenheit von Glucose diese Einflüsse verstärkt.
Auf den Einfluß von D_2O auf enzymatische Prozesse ist schon früher eingegangen worden. Es ist daher nicht weiter verwunderlich, daß sich in einem Medium hoher D_2O-Konzentration auch die Glykolyse erniedrigt. Über die Folgen für den Energiestoffwechsel ist schon im Kapitel "ATP-Bilanz" einiges ausgeführt worden.

Die unterschiedliche Beeinflussung der verschiedenen untersuchten Parameter durch D_2O spricht dafür, daß die Mechanismen, die zu einer Unterdrückung der Glykolyse durch Hyperthermie führen, möglicherweise anderer Natur sind, als die durch Proteindenaturierung hervorgerufenen Wirkungen auf die DNA-Synthese.

d) Der Einfluß der Hyperthermie auf die Vitalfärbung von Ascites-Tumorzellen

Nachdem wir im ersten Teil unserer Untersuchungen biochemische Parameter zur Messung der Schädigung von Tumorzellen durch Hyperthermie herangezogen hatten, interessierten uns im folgenden morphologisch erfaßbare Schädigungen.

Hier bieten sich 2 Untersuchungs-Methoden an:

1. Die Bestimmung von lebenden bzw. toten Zellen nach Anfärbung,
2. Die Untersuchung der Zellen mittels Elektronen-Mikroskop.

Wir untersuchten zunächst die Anfärbbarkeit der Tumorzellen. Hierzu eignen sich verschiedene Farbstoffe (Eosin, Trypanblau, Nigrosin usw.) (258).
Wir entschieden uns für die Methode nach KALTENBACH (259): die Anfärbung der Zellen mit Nigrosin.
In Übereinstimmung mit der in der Literatur benutzten Literatur sollen angefärbte Zellen hier als "tote" Zellen und nicht gefärbte als "lebende" Zellen bezeichnet werden.

Die Ascites-Tumorzellen wurden im üblichen Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer (pH 7,4) jeweils in H_2O bzw. D_2O bei 38° und $45^\circ C$ inkubiert. Anschließend wurde der Färbe-Index der Zellen bestimmt. Siehe Methodik M 9)!

Ergebnis:

Ascites-Tumorzellen haben (ca. 1 Woche nach Inokulation) einen Anteil von 5 - 10% "toter" = angefärbter Zellen. Dieser steigt mit zunehmendem Alter der Zellen.

Nach Inkubation bei 38° nimmt dieser Anteil anfärbbarer Zellen in H_2O wie in D_2O nur geringfügig zu. (Siehe ABB. 21).
Werden die Zellen dagegen bei 45° hyperthermiert, so zeigt sich

deutlich der Zusammenbruch ihrer Permeabilität:

In H_2O-Puffer sind nach 30 Minuten bei 46°C ca. 50% der Zellen "tot", während der entsprechende Wert für D_2O-Puffer mit nur 30% wesentlich niedriger liegt.
Länger andauernde Hyperthermie führt dann in beiden Fällen zu steilem Abfall der Werte der "lebenden" Zellen. Nach 60 Minuten in D_2O-Puffer sind praktisch alle Zellen anfärbbar.
(ABB. 21)

Die verminderte Anfärbbarkeit hyperthermierter Tumorzellen in D_2O im Gegensatz zu H_2O deutet auf eine Stabilisierung der Membranpermeabilität hin.
Auf Grund der Beobachtung, daß Tumorzellen, die vergleichsweise in Tyrode-Puffer (Ca^{2+}-haltig) inkubiert wurden, sowohl höhere Glykolysekapazität, als auch verminderte Anfärbbarkeit (ca. 10% gegen Krebs-Ringer-Lösung vermindert) zeigten, möchten wir annehmen, daß D_2O, ähnlich der Wirkung von Ca^{2+}, zu einer Stabilisierung der Membranen beiträgt.
Bei der Bewertung der Methode darf allerdings nicht übersehen werden, daß die Hitzekoagulation der Zellen eine genaue Auswertung sehr erschwert. Daher eignet sich sich das Verfahren unter unseren Bedingungen im allgemeinen nur für vergleichende Betrachtungen.

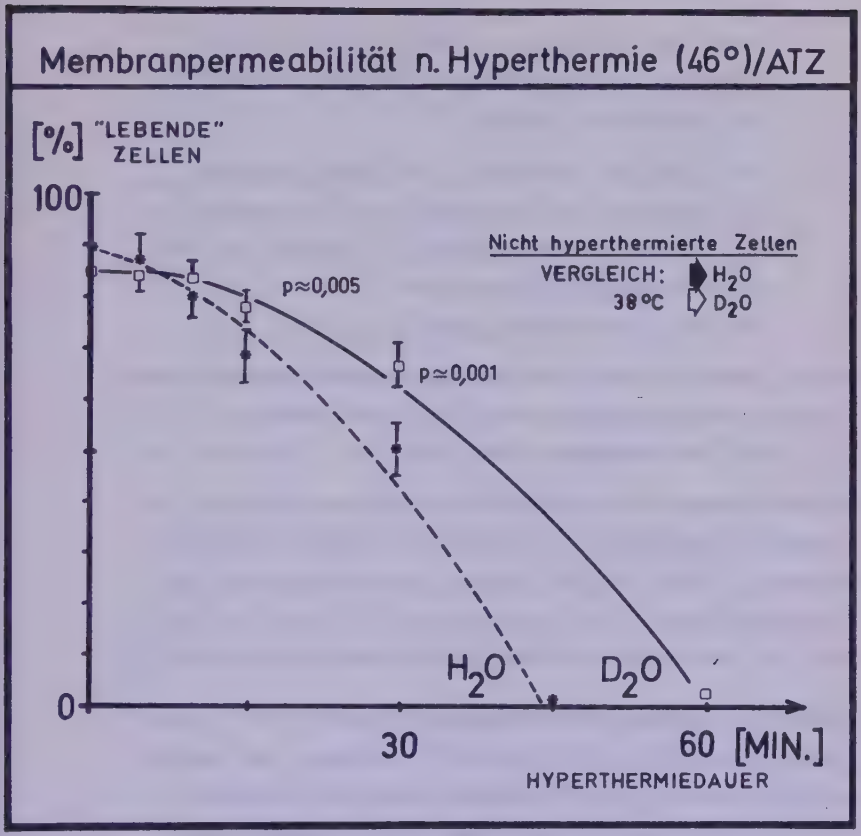


ABBILDUNG 21: Membranpermeabilität (ATZ) nach Hyperthermie

Inkubationsmedium: K-R-Phosphat-Puffer, pH 7,4 in H_2O bzw. D_2O
Jeweils ein Aliquot der Zellsuspension (ca.4%ig) wurde bei 46°C für die in der Abszisse angegebene Zeit hyperthermiert und anschließend der Färbeindex mit Nigrosin bestimmt (siehe M 9).
Zum Vergleich nicht hyperthermierte Zellen (38°, 60 Min.).

Anm.: Nicht gefärbte Zellen werden hier als "lebende" Zellen bezeichnet.
(n= 3)

e) Elektronenmikroskopische Befunde

Weitere morphologische Befunde sollte die elektronenmikroskopische Untersuchung der Ascites-Tumorzellen nach Hyperthermie erbringen.

Dazu wurden die Tumorzellen in ca. 4%iger Suspension ca. 8 Tage nach inocc. bei verschiedenen Temperaturen in H_2O- bzw. D_2O-Puffer vorinkubiert und sofort anschließend für die weitere Untersuchung fixiert.
Über die genaue Methodik siehe M 10)!

Auf die besonderen Strukturmerkmale der Ascites-Tumorzellen kann hier nicht weiter eingegangen werden, eine Studie findet sich z.B. bei SELBY und Mitarbeitern (260), NIKLOWITZ (261) u.a.

Bei den normalen Ehrlich-Ascites-Tumorzellen handelt es sich um vorwiegend abgerundete Zellen, die vereinzelt plumpe Ausläufer aussenden. Typisch für ihre Oberfläche sind zahlreiche Microvilli, die durchschnittlich $0,5\mu$ lang und bis zu $0,1\mu$ breit sind. Der Kern liegt meist etwas exzentrisch und ist nierenförmig ausgebuchtet.

Neben einer ausgeprägten Randchromatinverdichtung fällt ein relativ großer Nucleolus auf. Im Cytoplasma ist im Bereich der Kerneinbuchtung ein ausgeprägtes Cytozentrum lokalisiert, mit einem mittelgroßen Golgiapparat, der reichlich Vesikel enthält, einem Centrosom, einigen kleinen Granula und Mitochondrien. Diese Partikel kommen auch unregelmäßig verstreut im übrigen Cytoplasma vor. Sie sind klein, rund bis oval und vom Crista-Typ. Im übrigen Cytoplasma liegen zahlreiche freie Polysomen und einzelne Hohlräume des rauhen endoplasmatischen Retikulums.
(ABB. 22)

Tumorzellen, Inkubation bei 38°C/H_2O-Puffer, 30 Min.

Zellen, die 30 Minuten bei 38°C in H_2O-Puffer inkubiert worden waren, dienten zur Kontrolle der Versuche.
Unter den vorgenannten Bedingungen hat sich das elektronenmikroskopische Bild nicht wesentlich verändert. Die Zahl geschädigter Zellen ist jedoch vermehrt. Diese Zellen zeigen dann fragmentierte Zellmembranen, das Cytoplasma ist hell, die membranbegrenzten Zellorganellen sind geschwollen und der Kern zeigt Pyknose-Erscheinungen.
Daneben kommen einzelne Zellen vor, die bei sonst normaler Morphologie eine leichte Schwellung der Mitochondrien und der anderen membranbegrenzten Hohlräume aufweisen.
(ABB. 23, 24)

Tumorzellen, Inkubation bei 38°C/D_2O-Puffer (90%), 30 Min.

Wurden die Tumorzellen in Deuteriumoxid inkubiert, so waren gegenüber dem bisher beschriebenen Bild zwei Veränderungen zu registrieren:

1. Der Kern zeigt eine deutliche Verdichtung des Chromatins, ohne jedoch das übrige, aufgelockerte Cytoplasma deutlich zu beeinflussen. Die fast nicht durchstrahlbaren dichten Chromatinbezirke liegen als Randchromatin in der Peripherie oder isoliert in Form von Plaques mehr zentral.

2. Eine deutliche "Kontraktion" der Mitochondrien, die durch eine Verdichtung der Mitochondrien-Matrix und eine Erweiterung der intracristären Räume gekennzeichnet ist.
   Diese Form der Mitochondrien wird auch als "energized twisted" bezeichnet. Die übrigen Zellbestandteile sind gegenüber den Kontrollen unverändert.

(ABB. 25, 26)

Tumorzellen nach Hyperthermie bei 46°C, H_2O-Puffer/30 Min.

Unter diesen Bedingungen findet man in den meisten Zellen deutlich morphologische Zeichen einer Schädigung:

Starke Schwellung der membranbegrenzten Hohlräume, besonders der Mitochondrien, Pyknose der Kerne mit Zusammenbruch der Kernmembran.
Daneben kommen einzelne Zellen vor, die viele dieser Schädigungen auch zeigen, jedoch einen stark aufgelockerten Kern mit "Nucleinsäure-Flucht" aufweisen.
ABB. 27, 28

Tumorzellen nach Hyperthermie bei 46°C, D_2O-Puffer/ 30 Min.

Das hervorstechendste Unterscheidungsmerkmal gegenüber den in H_2O-Puffer inkubierten Ascites-Tumorzellen stellen die Mitochondrien dar. Sie sind nicht geschwollen, sondern deutlich kontrahiert. Die übrigen membranbegrenzten Hohlräume zeigen jedoch die oben beschriebenen Schwellungserscheinungen.
Das Chromatin ist zwar noch verdichtet, die Kernmembranen scheinen aber nicht betroffen zu sein.
Überhaupt sind alle Membranen, die nach Hyperthermie bei 46°C in H_2O deutliche Zerfallsneigungen haben, relativ intakt.
Einzelne stark geschädigte Zellen kommen, wie in allen inkubierten Serien, auch hier wieder vor.

ABB. 29, 30

Diskussion

Unsere Befunde zeigen eindeutig, daß Deuteriumoxid Ascites-Tumorzellen gegen Hyperthermieschädigung zu schützen vermag. Die von uns auf Grund der Ergebnisse der Nigrosin-Anfärbung vermuteten membranstabilisierenden Eigenschaften können hier durch elektronenmikroskopische Befunde gesichert werden.

Einer der Gründe kann möglicherweise in der stark verminderten Membranpermeabilität der Zellen durch D_2O liegen (157) und damit zusammenhängend mit Änderungen der Viskosität und der Ionenbeweglichkeit.
Andererseits wird durch Deuterisierung die Struktur der Membran selbst verändert. Dies führt ähnlich der im Kapitel ENZYME beschriebenen Vorgänge (festere D-Bindungen) zu einer Stabilisierung gegen den denaturierenden Einfluß hoher Temperaturen.

Veränderungen des Aktionspotentials von Nervenfasern durch D_2O wurden 1959 von SPYROPOULOS und EZZY (262) beschrieben. Sie erklärten die Einflüsse von D_2O mit Veränderungen des Proton-Transfers.
GARBY und NORDQUIST (263) erklärten dagegen die Änderungen der Leitungsgeschwindigkeit durch D_2O mit einem Wechsel des Widerstands. Sie fanden, daß besonders die Membranen beeinflußt werden. (siehe auch 264).
Interessant sind auch Befunde von KAMINER (265), der formulierte, daß D_2O den Calcium-Verlust im Muskel hemmt.

Verschiedene Methoden lassen also die gleiche Aussage zu, daß D_2O eindeutig zu den "stabilisierenden Einflüssen" gerechnet werden muß, ähnlich den Wirkungen erhöhter H^+- bzw. Ca^{2+}-Ionen-Konzentration oder Hyperosmolarität (266). Auf die Ähnlichkeit mit dem Ca^{2+}-Einfluß wurde schon bei der Glykolyse und der Anfärbung der Zellen hingewiesen!

Die von uns im Kapitel 3.2.2. getroffene Behauptung, daß der Einfluß der Hyperthermie sich insbesondere gegen die Membranen richtet, wird hier noch einmal bestätigt.

Die strukturelle Schädigung von Proteinen kann durch Deuteriumoxid vermindert werden. Dies konnten wir schon nach Messung der DNA-Synthese von Tumorzellen nach Hyperthermie annehmen.

Die von v.ARDENNE im Sinne einer Sensibilisierung verstandene Beeinflussung der Tumorzellen durch Hyperthermie bei anschließender Pharmakonbehandlung läßt sich dann u.a. mit leichterer Einschleusung der toxischen Substanzen in die Zelle verstehen.

- Elektronenmikroskopische Aufnahmen -

ABB. 22: Übersichtsbild einer Ascites-Tumorzelle (Ehrlich)
sofort nach der Entnahme fixiert
Vergrößerung: 9.800 x

N = Nucleus
No = Nucleolus
C = Cytozentrum mit Golgi-Apparat
= Hohlräume des rauhen Endoplasmatischen Retikulums
M = Mitochondrien
mv = Microvilli
X = dichte Chromatin-plugs
V = Vakuolen

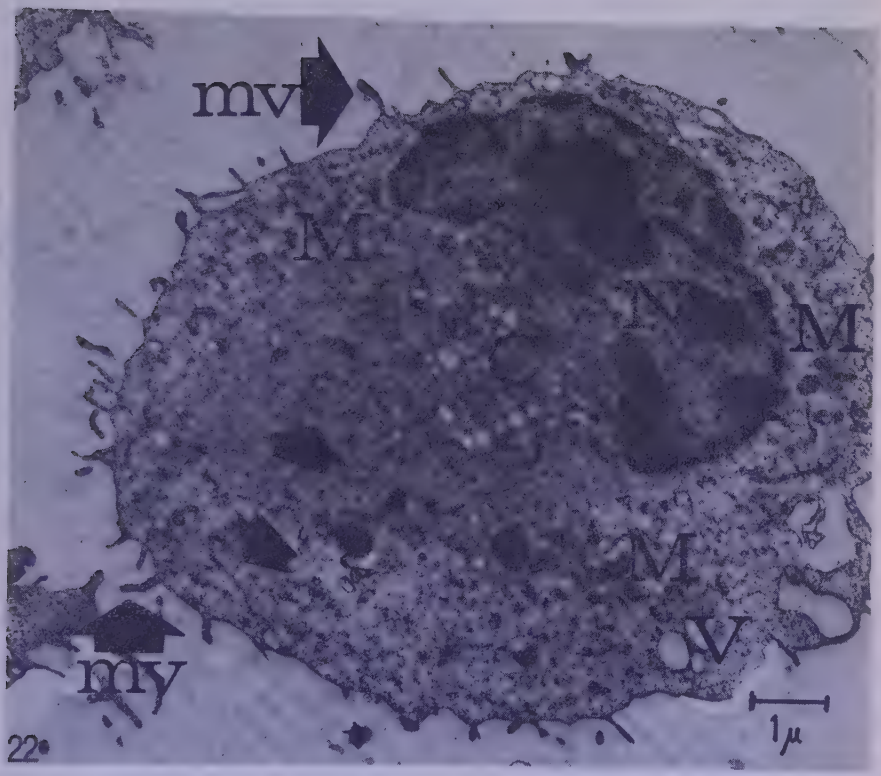


ABBILDUNG 22:

Die genaue Methodik entnehme man dem Text!

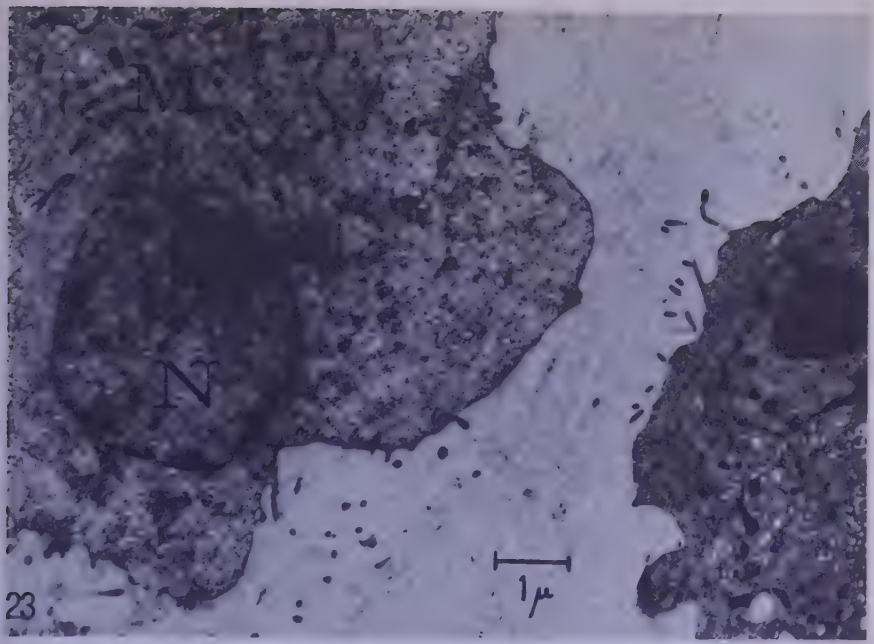
ABB. 23: Ascites-Tumorzelle (Ehrlich)
Inkubation in H_2O-Puffer, 38°/ 30 Min.
Vergrößerung: 9.800 x

M = Mitochondrien
N = Nucleus

ABB. 24: ebenfalls Inkubation in H_2O-Puffer, 38°/ 30 Min.
Vergrößerung: 29.400 x

Bei dieser stärkeren Vergrößerung sind besonders gut die intakte Kernmembran (Nm) sowie die vielen im Cytoplasma verstreuten Ribosomen zu erkennen.

No = Nucleolus
Nm = Kernmembran
M = Mitochondrien
V = Vakuolen
X = dichte Chromatin- "plugs"


M
N
1μ
23

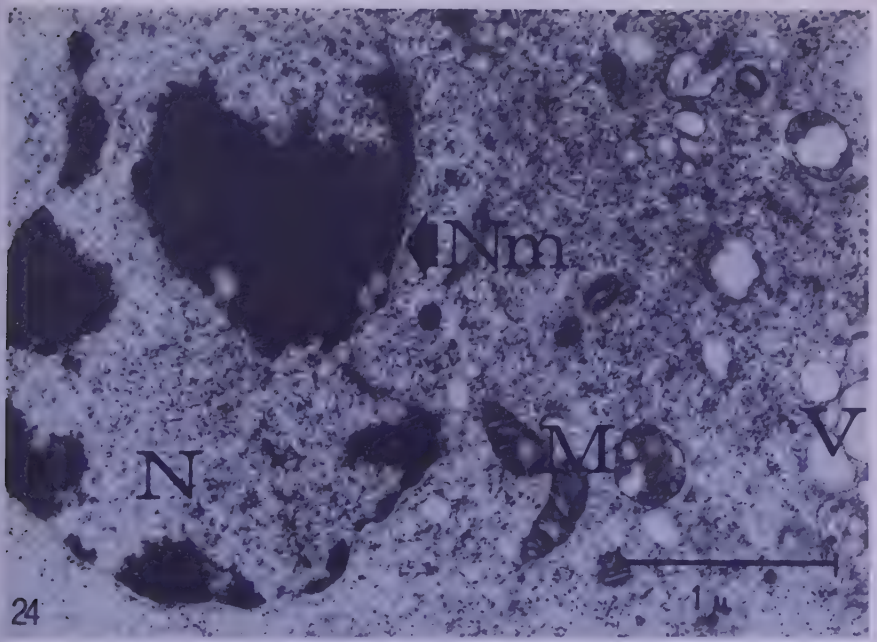

Nm
N
M
V
1μ
24

ABB. 25: Ascites-Tumorzelle (Ehrlich)

Inkubation in D_2O-Puffer, 38°C / 30 Min.

Vergrößerung: 19.600 x

Die hohe D_2O-Konzentration (90%) führt möglicherweise zu den auf beiden Fotos gut erkennbaren Kontraktionen der Mitochondrien (M)

O = freie Ribosomen

M = angedeutete Kontraktion der Mitochondrien

X = dichte Chromatin-"plugs"

ABB. 26: ebenfalls Inkubation in D_2O (s.o.)

Vergrößerung: 14.700 x

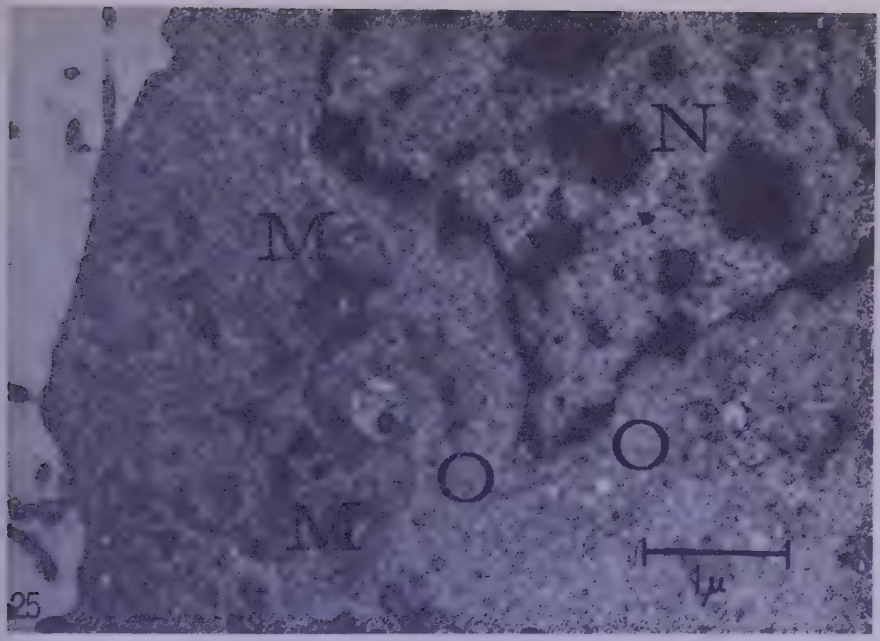
Neben der Kontraktion der Mitochondrien finden sich hier fast undurchstrahlbare Bezirke des Kernchromatins (starke Verdichtung)

X = deutliche Verdichtung des Chromatins

= deutliche Kontraktion der Mitochondrien

O - Ribosomen

V leicht erweiterte Vakuolen


N
M
O
O
M
1μ
25

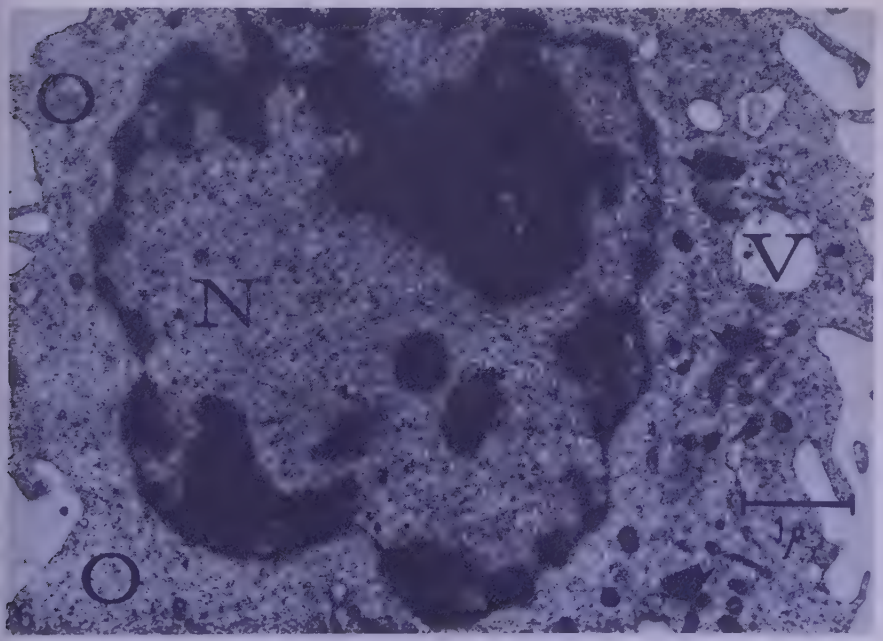

O
N
V
1μ
O

ABB. 27: Ascites-Tumorzelle (Ehrlich)

Inkubation in H_2O-Puffer, $46^{\circ}C$/ 30 Min.

Vergrößerung: 9800 x

Das Foto zeigt eine geschädigte Zelle mit stark vermindertem Kernchromatin ("Nucleinsäureflucht") und geschwollenen Zellorganellen

N = Nucleus (stark aufgelockerter Kern mit sog. "Nucleinsäureflucht"

✻ = stark geschwollene Zellorganellen

ABB. 28: Inkubationsbedingungen s.o.!

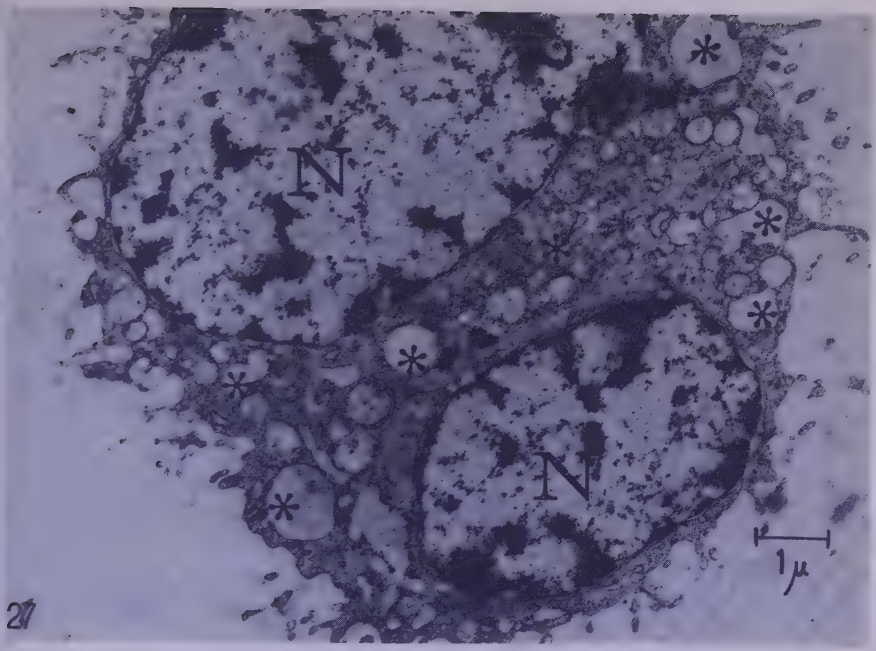
Vergrößerung: 19.600 x

Neben den schon oben gezeigten Schädigungen sind hier deutlich die fragmentierten Kernmembranen zu erkennen, ein typisches Merkmal für die starke Schädigung der Zellen durch Hyperthermie

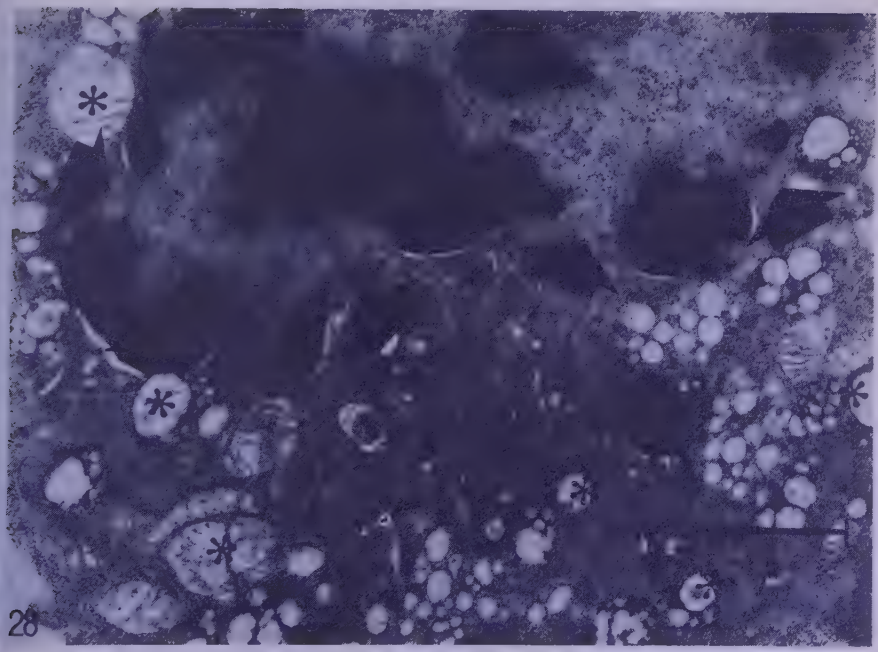
X = Chromatin-Verdichtung

= fehlende Kernmembran

✻ = geschwollene Zellorganellen im Cytoplasma



27



28

ABB. 29: Ascites-Tumorzelle (Ehrlich)

Inkubation in D_2O-Puffer, 46°C/ 30 Min.

(Vergrößerung: 19.600 x)

Die Zelle zeigt geringere Schädigung als eine in H_2O hyperthermierte Zelle:

Cytoplasma ohne Veränderungen (keine Zeichen einer Schädigung), weiterhin: erhaltene Kernmembran

No = Nucleolus

X = verdichtetes Chromatin im Zellkern, jedoch

= deutliche Kernmembran

ABB. 30: Inkubationsbedingungen wie oben

(Vergrößerung: 29.400 x)

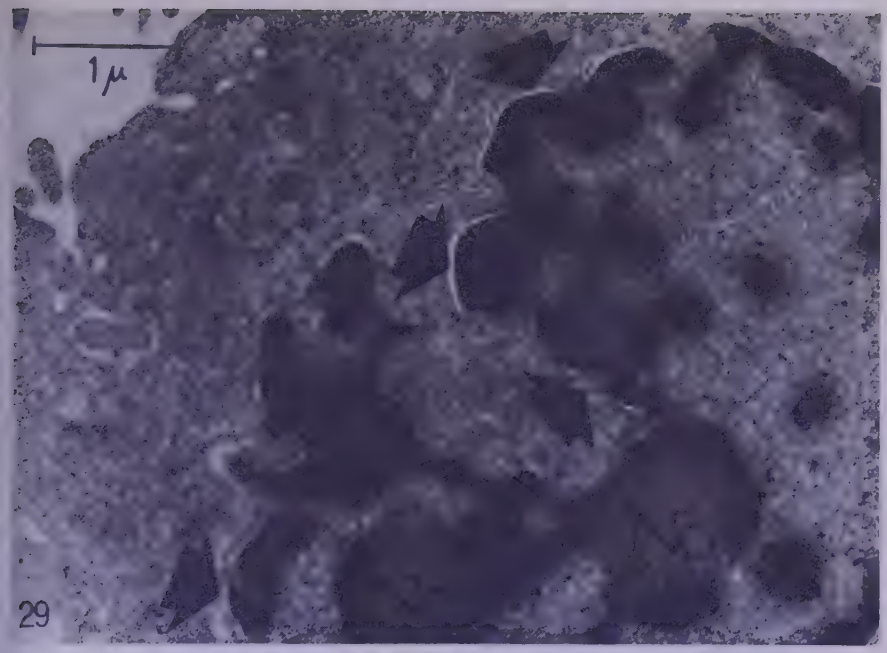
M = deutliche Kontraktion der Mitochondrien

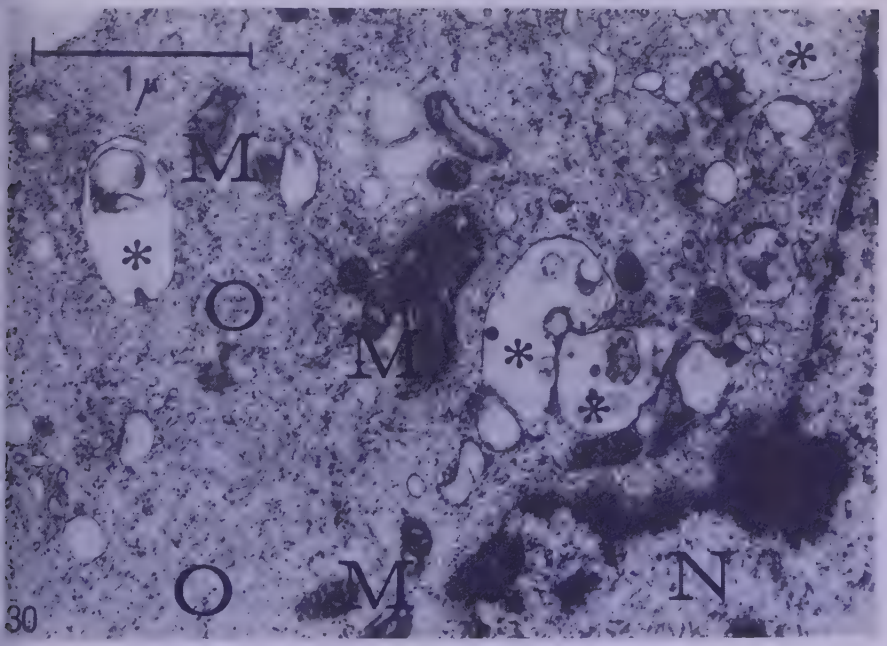
jedoch auch:

* = Schwellungserscheinungen anderer membranbegrenzter Hohlräume

O = freie Ribosomen

N = Nucleus


1µ
29


1µ
M
O
M
O
M
N
30

B) Andere denaturierende Einflüsse (Alkylantien)

= Tris-Äthylenimino-benzochinon (TRENIMON)^{R}

Nachdem wir eine weitreichende Schädigung von Tumorzellen durch Hyperthermie bestätigend nachweisen konnten, interessierte uns, ob sich die Schädigung der Zellen durch Alkylantien verstärken läßt und welchen Einfluß Deuteriumoxid dabei ausübt. Aufgrund unserer früheren Ergebnisse (3.2.3.a) bei der Messung der DNA-Synthese war hier ebenfalls ein gewisser Schutz gegen die Schädigung der Tumorzellen in D_2O zu erwarten.

Wir nahmen als Parameter der Schädigung der Zelle hier ebenfalls die DNA-Synthese der Ascites-Tumorzellen.

Zahlreiche Veröffentlichungen über die Wirkungsweise von TRENIMON^{R} machen es überflüssig, darauf noch einmal näher einzugehen (siehe z.B. 267,268).

Der wesentliche Teil der Wirkung von Alkylantien läßt sich auf folgende Beeinflussungen zurückführen:

1. Wirkung auf den Energiestoffwechsel (Glykolysehemmung)
2. Wirkung auf den Protein- u.Nucleinsäure-Stoffwechsel.

Die Einwirkung auf Nucleinsäuren führt dann zu weiteren Schädigungen:

1) Alkylierte Nucleinsäuren (gestörte Wasserstoffbrückenbildung)
2) Herausgeschlagene Basen (Guanin)
3) Abgebrochene Ketten
4) Vernetzte Ketten.

Die Tumorzellen wurden gemäß bekannter Methodik (ABB. 8) mit und ohne TRENIMON^{R} vorinkubiert (siehe auch 3.2.3.a) und anschließend mittels ^{3}H-Thymidin-Einbaus die DNA-Synthese bestimmt (Methodik wie M 4).

Die TRENIMON^{R}-Konzentration betrug 10^{-5}m.

Die Ergebnisse sind in TABELLE 4 dargestellt.

Drückt man die Ergebnisse als Quotient der DNA-Synthese ohne TRENIMON-Zusatz dividiert durch die DNA-Synthese mit TRENIMON-Zusatz aus, so werden die komplizierten Resultate etwas übersichtlicher.

$$Q = \frac{\text{DNA-Synthese ohne TRENIMON } (^3\text{H-Thymidin})}{\text{DNA-Synthese mit TRENIMON}}$$

Je höher der Q-Wert ist, desto wirksamer war der TRENIMON-Zusatz.

H_2O-Puffer:

Die zur Kontrolle in Eis gehaltenen Tumorzellen machen deutlich, daß hier die Inaktivierung von TRENIMON am geringsten ist. Bei pH 7,4 bedeutet der Zytostatica-Zusatz eine Reduktion der DNA-Synthese um fast 50% (Q= 1,98). Insgesamt spielt der pH-Wert nur eine geringe Rolle.
Werden die Tumorzellen für 60 Minuten bei 38°C vorinkubiert, so erkennt man, daß die Wirkung von TRENIMON mit fallendem pH-Wert abnimmt. Für pH 7,4 wird der höchste Wert mit Q= 2,37 erreicht.
Die Hyperthermie-Temperatur 46°C führt dagegen neben der bekannten Schädigung der Tumorzellen auch zur schnelleren Inaktivierung der Substanz.

D_2O-Puffer (90%):

Während bei den Kontrollen noch eine geringfügige Verstärkung der Schädigung durch TRENIMON festzustellen ist, die mit fallendem pH-Wert zunimmt (pH 6,5: Q= 1,66), so fallen bei den höheren Temperaturen 38° bzw. 46°C deutliche Unterschiede gegenüber Wasser auf: Hier überwiegen praktisch die Eigenwirkungen von D_2O, d.h. TRENIMON zeigt nahezu keinen Einfluß

Quotienten der TRENIMON^{R}-Wirkung in H_2O / D_2O

	pH-Wert	H_2O-P.	D_2O-Puffer	p=
Kontrolle (Eis)				
	7,4	1,98 ± 0,16	1,28 ± 0,06	< 0,0025
	7,0	1,35 ± 0,12	1,57 ± 0,10	< 0,05
	6,5	1,54 ± 0,08	1,66 ± 0,08	> 0,05
38°C/ 60 Min.				
	7,4	2,37 ± 0,12	1,20 ± 0,11	< 0,0005
	7,0	1,87 ± 0,06	1,02 ± 0,01	< 0,0005
	6,5	1,71 ± 0,2	1,11 ± 0,09	< 0,005
46°C/ 30 Min.				
	7,4	1,0 ± 0,15	1,13 ± 0,05	> 0,10
	7,0	1,13 ± 0,09	1,07 ± 0,03	> 0,05
	6,5	1,48 ± 0,36	1,11 ± 0,09	> 0,05

TABELLE 4

$$Q = \frac{\text{DNA-Synthese (ATZ) ohne TRENIMON}}{\text{DNA-Synthese (ATZ) mit TRENIMON}}$$

Zahl der Versuche (n) = 3

aufgetragene Signifikanz (p) = H_2O / D_2O

Die Versuchsanordnung entspricht ABB. 8, weitere Angaben entnehme man dem Kapitel 3.2.3.a) sowie Methodik M 4)!

mehr auf die DNA-Synthese der Ascites-Tumorzellen.
In beiden Fällen liegen die Quotienten um 1,1.
Ein unterschiedlicher pH-Wert macht sich ebenfalls nicht bemerkbar.

Man sieht also, daß in D_2O (90%) bei 38° und 46° die schädigende Wirkung von TRENIMON praktisch aufgehoben ist.

3 Deutungsmöglichkeiten kommen für diese Effekte in Frage:

1. Durch zunehmende Temperatur erfolgt Deuterierung der DNA. Damit verbunden ist einerseits eine verminderte thermische Denaturierung, andererseits auch geringere Angriffsmöglichkeiten für das alkylierende Agens.
2. D_2O bewirkt eine stärkere Stabilisierung der Aziridin-Ringe im TRENIMON und hat dadurch geringere Reaktionsfähigkeit bzw. Toxizität zur Folge.
3. Weiterhin laufen Reaktionen in D_2O in einem Medium geringerer H^+-Ionen-Konzentration ab und aus der geringeren Dissoziation der Substanz in D_2O ergibt sich verringerte Aktivität, also scheinbar geringere Konzentration des gelösten Stoffes.

Untersuchungen von BOTTINI und ROBERTS (269) konnten zeigen, daß D_2O bei Raumtemperatur die Stabilität von Äthylaziridin und ähnlichen Verbindungen (Bausteinen der alkylierenden Substanz TRENIMON) auf das ca. 25fache erhöht.
Es ist daher nicht möglich, eindeutig zu entscheiden, ob die lange Inkubation in D_2O zur Verminderung der DNA-Synthese der Tumorzellen und damit zu einer Schädigung geführt hat, die eine weitere Schädigung ausschließt, oder ob die Reaktionsfähigkeit der alkylierenden Verbindung drastisch herabgesetzt wird.

Neben der Beantwortung dieser Frage ist als weiteres interessantes Problem die Untersuchung der Möglichkeit, empfindliche bzw. besonders reaktionsfähige Substanzen durch D_2O zu stabilisieren, offengeblieben. Da dies ein galenisches Problem ist, haben wir es nicht weiter verfolgt.

4. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde unter verschiedenen Bedingungen der Einfluß hoher Temperaturen (HYPERTHERMIE) auf Normalgewebe und Ehrlich-Ascites-Tumorzellen ("ATZ") unter dem Gesichtspunkt der Verwendung von Deuteriumoxid als stabilisierender Faktor untersucht.

Wir konnten in Übereinstimmung mit Literatur-Befunden (191), jedoch im Gegensatz zu Untersuchungen von MEYER (148) nachweisen, daß die DNA-Synthese von Normalgewebe (Leber, Maus) nicht temperaturempfindlich ist. Diese Wirkung der Hyperthermie tritt nur auf, wenn das Gewebe vorher z.B. durch Trypsinieren geschädigt wird.

Daher glauben wir, sagen zu können, daß die hohe Temperaturempfindlichkeit vieler Tumore (z.B. auch ATZ) einer Folge ihrer Membranschädigung ist.

Wir untersuchten den Hyperthermie-Einfluß auf verschiedene biochemische Parameter sowie auf morphologische Veränderungen der Ascites-Tumorzellen.

Auf Grund vorliegender Befunde, die zeigen, daß Deuteriumoxid (D_2O) in der Lage ist, sowohl die thermische, als auch die Harnstoff-Denaturierung von Enzymen (hier: Lactat-Dehydrogenase) zu vermindern, sollte geprüft werden, ob D_2O auch bei komplizierten biologischen Systemen toxische Einflüsse reduziert.

Wir konnten bestätigen, daß hohe D_2O-Konzentrationen zu einer Hemmung verschiedener Reaktionsabläufe führen. Dies, wie auch die relative "Strukturerhöhung" von Proteinen (Beispiel LDH) gegen schädigende äußere Einflüsse, ist wahrscheinlich die Folge von Isotopen-Austauschreaktionen von H-Atomen der Proteine mit dem umgebenden Medium.

Wurden die Ascites-Tumorzellen in H_2O-Puffer dem schädigenden Einfluß der Hyperthermie ausgesetzt, so zeigte sich der starke Grad der Schädigung an einem Absinken der DNA-Synthese, Reduzierung der aeroben Glykolysekapazität, Abfall der ATP-Werte

und Zusammenbruch der Membranpermeabilität.
Deuteriumoxid war in der Lage, bei hoher Temperatur (ab ca.44°C) das Ausmaß der Schädigung der DNA-Synthese zu reduzieren, im unteren Temperaturbereich überwiegen die Eigenwirkungen (Hemmung der Syntheseleistungen) von D_2O.
Die aerobe Glykolyse wurde in beiden Fällen jedoch gleich stark geschädigt.
Der ATP-Spiegel sank in D_2O nach Hyperthermie noch schneller als in H_2O.
Da aus der Literatur der schädigende Einfluß der Hyperthermie auf die Atmung bekannt ist (255), D_2O weiter in hoher Konzentration den Sauerstoffverbrauch herabsetzt und kompensatorische energieliefernde Reaktionsabläufe verlangsamt, scheint der etwas stärkere Abfall des ATP-Spiegels in D_2O erklärlich.

Unklarheit besteht jedoch weiterhin über den Schwerpunkt der Hyperthermie-Schädigung:
Während einige Autoren in der Schädigung der Atmung durch Hyperthermie Möglichkeiten für eine Therapie sehen, legen andere größte Bedeutung auf die Schädigung der glykolytischen Fähigkeiten der Tumorzelle (268).
Uns scheint jedoch, daß die größte Bedeutung der Hyperthermie in einer unmittelbaren und direkten Beeinflussung der Proteine liegt, wobei durch thermische Denaturierung irreversible Schäden in der DNA-Synthese oder RNA-Synthese (201) auftreten.
Die starke Beeinflussung der Proteine durch Hyperthermie zeigt sich z.B. an einem schnellen völligen Zusammenbruch der Permeabilität der Zellen, erkennbar an der starken Farbstoff-Aufnahme (Nigrosinfärbung). Dies konnte von uns durch elektronenmikroskopische Befunde an Membranen u.ä. gestützt werden, und nur auf diesem "strukturellen" Gebiet konnte D_2O stabilisierend gegen Hitzeschädigung wirksam werden.

Wir konnten zeigen, daß die Membranpermeabilität von Ascites-Tumorzellen (Ehrlich) nach Hyperthermie in D_2O gegenüber H_2O deutlich verringert ist. Dies gilt ebenso für elektronenmikroskopische Befunde an Zellmembranen, Nucleus und anderen Zellorganellen.

Eine primäre Hemmung des Energiestoffwechsels dürfte also als alleinige Ursache der Hitzeschädigung nicht in Frage kommen, da die Verwendung von D_2O hinsichtlich der Glykolyse-Kapazität oder ATP-Werte eher eine stärkere Hemmung als eine Verbesserung der Zell-Leistung brachte. Dagegen war die DNA-Synthese nach $46^{\circ}C$-Hyperthermie in D_2O gegenüber den entsprechenden H_2O-Werten signifikant erhöht.
D_2O vermindert nicht nur die thermische Denaturierung der Ascites-Tumorzellen, sondern hebt z.B. auch den toxischen Einfluß des Zytostatikums TRENIMON^{R} (bei 38° bzw. $46^{\circ}C$ Inkubation) praktisch auf. Allerdings konnte nicht geklärt werden, ob dies primär auf eine Reaktion des Zytostatikums mit dem Deuteriumoxid oder mehr auf die Deuterierung der Makromoleküle der Zelle zurückzuführen ist.

Einige Ergebnisse der D_2O-Wirkung bei der Hyperthermie von Ascites-Tumorzellen sind in TAB. 5 dargestellt:

Ergebnisse der Inkubation von Ascites-Tumorzellen in H_2O / D_2O

		H_2O	D_2O
DNA-SYNTHESE:			
HWT		$39,75^{\circ}$	$41,0^{\circ}$
HWZ - 38°	ca.	75 Min.	ca. 40 Min.
46°	ca.	3 Min.	ca. 5 Min.
1°		105 Min.	200 Min.
ATP-SPIEGEL:			
HWZ - 46°		10 Min.	6 Min.
(37°		32 Min.	13 Min.)
AEROBE GLYKOLYSE:			
HWT		42°	42°
HWZ - 46°		13 Min.	8 Min.
MEMBRANPERMEABILITÄT: (Nigrosin-Färbung)			
HWZ - 46°	ca.	30 Min.	ca.45 Min.

TABELLE 5

HWT = Halbwertstemperatur

HWZ = Halbwertszeit

(Die mit"ca." angeführten Werte sind Schätzungen)

5. MATERIAL und METHODEN

A) Material:

1) Tiere:

a) Ratten- Wistarratten, 150 - 200g, 8 - 14 Wochen alt

b) Mäuse- männl. bzw. weibl. Albinomäuse (NMYR/ CF 1) ca. 25g schwer, 4- 8 Wochen alt

beide aus der Zucht der Fa.Hagemann,Hannover-Bösingfeld Ernährung: ALTRUMIN, Wasser ad lib.

c) Fische- Black Mollies (Mollienisia spec.) ca.1g schwer

Fa. KARSTADT, Berlin, Ehrnährung: TETRA-MIN Futter

2) Chemikalien:

Die verwendeten Chemikalien hatten, wenn nichts anderes angegeben, den Reinheitsgrad "pro analysi"

Die Bestimmung von Enzymen bzw. Substraten erfolgte mit BOEHRINGER Testcombinationen.

D_2O (99,7%), reinst	Firmen:	NEN, Dreieichenhain ROTH, Karlsruhe MSD, München
Thymidin-methyl-T (2 - 5 Ci/mMol)	Firma:	Amersham-Buchler, Braunschweig
Äthylenimino-2,3,5-benzochinon (TRENIMON)		BAYER, Leverkusen
Szintillationschemikalien der Firmen		BECKMAN u. MERCK

sowie:

UNISOLVE^R	Koch-Light Laboratories
INSTA-GEL^R	Packard Instr.Comp.Inc.

3) Geräte:

Flüssigkeitsszintillationszähler LS 150	BECKMAN, München

Gefriertrocknungs-Anlage "Delta I"	CHRIST, Aibach-Ob.
Mikromat-Verbrennungs-Anlage BF 5010	Berthold & Friesecke, Karlsruhe
Gefriertruhe	Vötsch
Warburg-Schüttelthermostat	Braun-Melsungen
Schüttelwasserbad 3047	Köttermann
Eppendorf-Photometer	Netheler & Hinz, Hamburg
Varian A 60-A (NMR-Spektrosk.)	Varian, Darmstadt
DC-Scanner II mit Autochronschreiber	Berthold, Wildbad
Osmometer (Kryoskopie-Gerät)	KNAUER, Berlin 37
Elektronenmikroskop El-Miskop I/101	SIEMENS

B) Methodik:

M 1) Lactat-Dehydrogenase (Schädigung und Bestimmung)

Es handelte sich um LDH, Kaninchenmuskel (Boehringer 15371).

Die Versuchsdurchführung geschah entsprechend ABB. 6.

Die Konzentration für LDH betrug normalerweise $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ mg/ml, bei der Untersuchung der Proteinkonzentrations-Abhängigkeit die im Text angegebene Menge.
Das Enzym wurde in der jeweiligen Konzentration in Phosphat-Puffer (50 mMol) entweder in H_2O oder D_2O gelöst.
Bei der Bestimmung der D_2O-Konzentrations-Abhängigkeit wurden D_2O-Konzentrationen von 20, 40, 60, 80, 90 und 99,7% mit den entsprechenden Salzen hergestellt und darin LDH gelöst.
Zur Kontrolle wurden die Enzymaktivitäten bei 25°C bestimmt. Jeweils ein Aliquot der LDH-Puffer-Lösung wurde für 10 Minuten der entsprechenden Temperatur ausgesetzt und anschließend sofort die Enzymaktivität im optischen Test bei 25°C gemessen.
Im allgemeinen diente der bei 25°C ermittelte Wert der LDH-Lösung als 100%-Wert, lediglich bei den in ABB. 3 dargestellten Werten wurden die gemessenen Enzymaktivitäten auf 38°C = 100% umgerechnet.

Die Bestimmung der LDH-Aktivität erfolgte nach der Methode von WROBLEWSKI (277) mit BOEHRINGER Testcombination 15948 in den dort vorgeschriebenen Konzentrationen.

M 2) DNA-Synthese von Leberschnitten (Maus)

Der getöteten Maus wurde unmittelbar nach Dekapitation das Organ (Leber) entnommen und in eiskalten Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer (pH 7,4) überführt. Nach dem Waschen wurden mit einer Rasierklinge unter Kühlung kleinste Schnitte (max. 0,1 mm dick) angefertigt.

Die Schnitte wurden sofort in gekühlte Inkubationsgläschen überführt und zur Kontrolle gewogen. Das Feuchtgewicht betrug jeweils etwa 15 mg.

Anschließend wurden die Schnitte jeweils in H_2O- bzw. D_2O-Puffer bei verschiedenen Temperaturen vorinkubiert, das Inkubationsmedium abgegossen und die Schnitte in frischem H_2O-Puffer (pH 7,4), enthaltend 5 µCi ^3H-Thymidin pro 1 ml, für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Nach erfolgter Inkubation wurden die Gefäße in Eis abgekühlt, das Medium abzentrifugiert, 2x mit Wasser gewaschen und danach 2x mit Äther/Äthanol (1:1) extrahiert.

Die einzelnen Schnitte wurden auf kleine Verbrennungsschälchen übertragen und ihr Feuchtgewicht (FG) bestimmt. Anschließend wurden die Schälchen in eine Gefriertrocknungsanlage überführt und die Schnitte bis zum völligen Wasserverlust getrocknet. Das Trockengewicht der Schnitte wurde bestimmt.

Nun erfolgte die Verbrennung der Proben mit dem MICROMAT (270) und danach die Bestimmung der Thymidin-Einbauraten mit einem Flüssigkeits-Szintillationszähler.

Die ermittelten Einbauraten wurden bezogen auf 1 mg Trockengewicht der Leberschnitte.

Krebs-Ringer-Puffer: (pH 7,4)
20 T. Sörensen-PO_4-Puffer
105 T. Krebs-Ringer-Lösung

3) Fisch-"Monitor-Test"

In zahlreichen Untersuchungen (220 - 223) wurde darauf hingewiesen, daß die Atmung in Schwerem Wasser gehemmt wird.
Nachdem frühere Versuche von MEYER auf eine verminderte thermische Schädigung von Fischen in D_2O hindeuteten (148), wollten wir als Vorversuch klären, ob die Überlebensdauer von Fischen in Schwerem Wasser bei Sauerstoffmangel verlängert wird.

Die Versuchsdurchführung geschah zunächst nach der von MEYER (148) beschriebenen Methode.

Dazu wurden die Fische (Mollienisia spec.), ca. 1 g schwer, in ein Becherglas mit vorher ausgekochtem und wieder abgekühltem Wasser gebracht, durch das ein leichter Stickstoffstrom geleitet wurde. Unmittelbar danach wurde das Gefäß verschlossen.

Im Falle von D_2O wurden die Fische vorher eine ausreichende Zeit adaptiert. Die D_2O-Konzentration betrug 40% (Letalitätsgrenze).

Als Zeichen der Schädigung des Fisches wurde die Zeit bis zum Aussetzen der Kiementätigkeit genommen.
Das Aussetzen der Kiementätigkeit geschah:

in H_2O (Sauerstoffmangel) nach 54 ± 8 sec.,

in D_2O (Sauerstoffmangel) nach 122 ± 18 sec.

Die Zahl der Versuche (n) betrug 20.

Es zeigt sich also, daß bei Sauerstoffmangel die Fische langsamer in 40%igem Deuteriumoxid geschädigt wurden. Ihr Sauerstoffbedarf erscheint in D_2O niedriger.

Nun haften der Methode jedoch einige Nachteile an, u.a. ist der Grad der Schädigung schlecht zu erkennen und die Fische sind meist zu sehr in Mitleidenschaft gezogen.

Da ein entsprechender Test jedoch einige Bedeutung zur Kontrolle von Gewässern hat, versuchten wir, ein verbessertes Modell zu konstruieren.

Als Merkmal und Maß der Schädigung wurde daher das Unvermögen der Fische, sich in einer gerichteten Strömung schwimmend zu halten, gewählt (224, 225).

Zwei Modelle wurden von uns konstruiert, in denen sich unter geringem experimentellen Aufwand der Grad der Schädigung rasch bestimmen läßt. Außerdem ist der Eintritt der Schädigung früh genug, um eine deutliche Aussage machen zu können.

Das 2.Modell eignet sich besonders wegen des relativ geringen Volumens (Preis - D_2O!) für unsere Experimente.

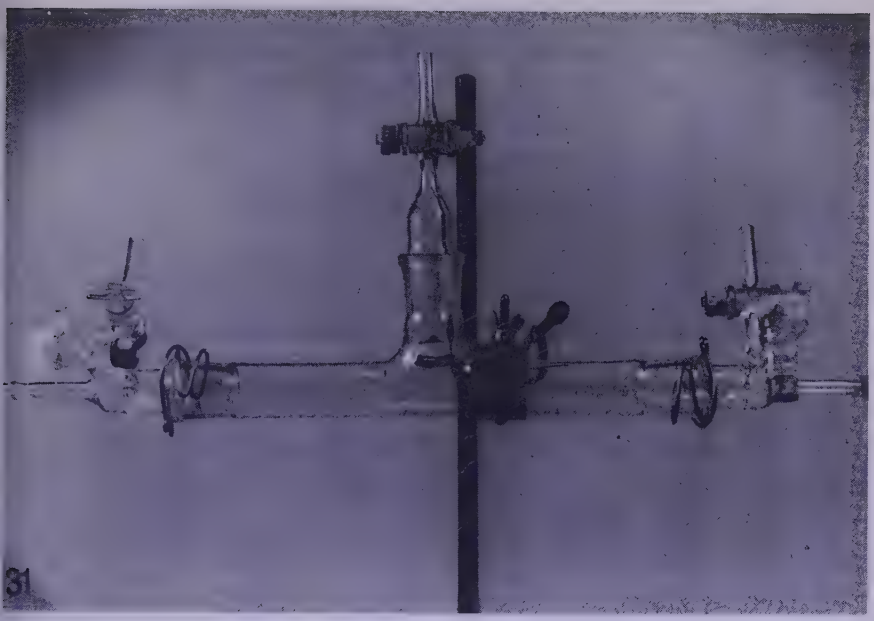
ABB. 31 zeigt eine Versuchsanordnung.

Durch eine Röhre von ca. 30 cm Länge und 3 cm Durchmesser wird ein kontinuierlicher Wasserstrom gepumpt. Die Röhre hat zu beiden Enden ein Sieb, das ein Hindurchtreten des Fisches verhindert. Einleitungsrohre mit Hähnen an beiden Enden ermöglichen die Begasung bzw. Belüftung des Systems.

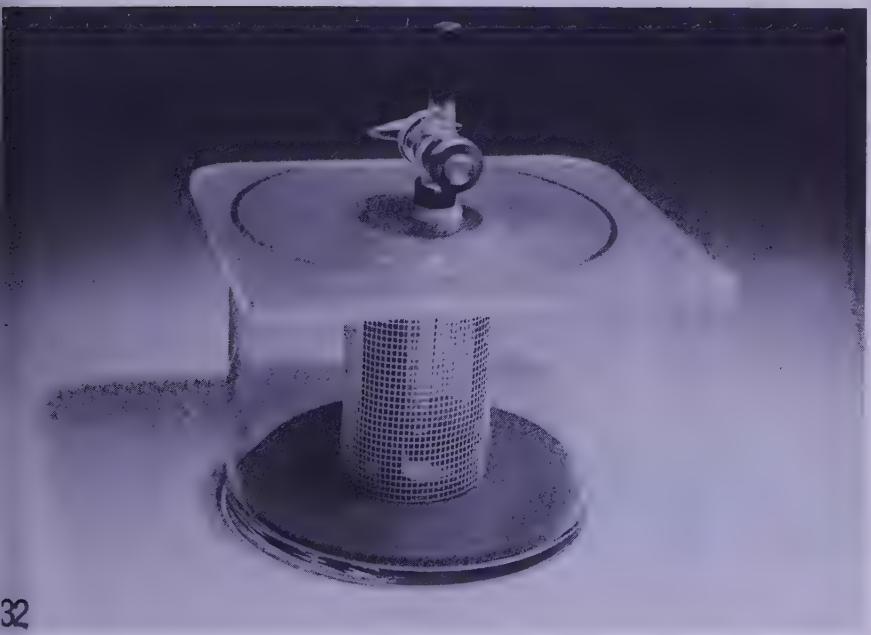
Da der Fisch das Bestreben hat, der Strömungsrichtung des Wassers entgegengerichtet zu schwimmen, ist das Eintreten einer etwaigen Schädigung früh genug und eindeutig zu erkennen, wenn der Fisch mitgerissen wird und z.B. 5 sec. gegen das Gitter gepresst wird. Die Belastung des Fisches erfolgt kontinuierlich. Der Fisch kann sich nicht untätig zu Boden sinken lassen und eine Schädigung vortäuschen.
Allerdings wurde das Modell wegen des großen Volumens (mit Pumpe und Strömungsgeschwindigkeitsmesser ca. 700 - 1000 ml) nur mit Wasser von uns experimentell genutzt.

In der Versuchsanordnung II (ABB. 32) ist auf kleinstem Raum das Prinzip der Strömung eingehalten:

In einem zylindrischen Glasgefäß (Höhe ca. 6 cm, Durchmesser



31



32

ca. 8 cm) befindet sich ein zylindrischer Siebeinsatz. In dem hierdurch abgegrenzten Innenraum befindet sich ein Magnetkern, der durch einen Magnetrührer in schnelle Bewegung versetzt werden kann. Dadurch entsteht im Gefäß eine relativ starke Strömung. Das Gefäß kann mit einer Platte verschlossen werden, es besteht jedoch die Möglichkeit der Be- und Entlüftung.

Auch hier zeigt der Fisch das Bestreben, entgegen der Strömung zu schwimmen. Der Schädigungseintritt läßt sich gut erkennen, wenn der Fisch sich in der Strömung nicht mehr halten kann und daher mitgerissen wird.

Da sich unser Modell den Größenverhältnissen der Fische oder sonstigen Anforderungen gut anpassen läßt, erscheint es für entsprechende Versuche gut geeignet.

In der Zwischenzeit erschien eine Veröffentlichung von HAESER (226), die den verminderten Sauerstoff-Verbrauch bei Fischen in D_2O bestätigte. Daher sind wir diesem Problem mit Fischen nicht weiter gefolgt.
Weitere Versuche über den Einfluß von Sauerstoffmangel und Hyperthermie an trypsinierten Leberzellen sowie Ascites-Tumorzellen brachten keine eindeutigen Ergebnisse. Daher verzichten wir hier auf eine Darstellung der Befunde.

Für Diskussion und Hinweise zum Thema "Fischtest" bin ich Herrn Prof.Dr. D.Lüdemann, Institut f. Wasser-, Boden- und Lufthygiene in Berlin-Dahlem zu Dank verpflichtet.

M 4) Bestimmung der DNA-Synthese (^{3}H-Thymidin-Einbau)

Die DNA-Synthese der Zellen wurde durch Messung der Einbauraten von Thymidin-methyl-T (2-5 Ci/mMol) in die in kalter 10%iger Trichloressigsäure (TCA)unlösliche Fraktion ermittelt (siehe 271).
Wenn nichts anderes angegeben, wurden zur Inkubation ca. 4 %ige Zellsuspensionen verwendet und zur Vereinheitlichung alle Ergebnisse auf 1%ige Suspension umgerechnet.

Dazu wurden die jeweiligen Zellen oder Gewebe nach erfolgter Vorinkubation mit ca. 5 μCi/ml ^{3}H-Thymidin in Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer (pH 7,4) für 30 Minuten bei 37° bzw. 38°C im Warburg-Apparat inkubiert.

Die Synthese wurde durch Kälteschock abgestoppt. Anschließend wurden nach gründlicher Durchmischung der Suspension (Whirlmix) jeweils mehrere Aliquotmengen von 0,1ml dem Ansatz entnommen und auf einen Filterpapierstreifen aufgetragen (ca. 3cm breit, 50cm lang/ Whatman^R 3 MM).

Für jedes Aliquot betrug die benetzte Fläche ca. 4 cm^2.

Die Streifen wurden sofort mit heißer Luft getrocknet, in eiskalte 10%ige TCA-Lösung gebracht und nach einiger Zeit zweimal mit 5%iger kalter TCA-Lösung gespült. Für 100 Proben wurde jeweils etwa 1 Liter der Flüssigkeit benötigt.

Anschließend wurden die Streifen in Äther/Äthanol (1:1) überführt, zweimal gewaschen und daraufhin noch zweimal mit Äther gespült. Nach erfolgter Trocknung an der Luft wurden die Proben einzeln ausgeschnitten und in Szintillatorfläschchen überführt.

Nach Zugabe des nötigen Szitillator-"Cocktails" (verschiedene Firmen) wurde die Restaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt. (Durchschnittliche Meßzeit 10 Minuten).

Eigenes Szintillatorgemisch:

5,0 g PPO (2,5-Diphenyloxazol)
100,0 g Naphthalin, reinst
ad 1000,0 ml Dioxan (bidest.)

M 5) Bestimmung der D_2O-Konzentration

Im allgemeinen wurde die D_2O-Konzentration der Puffer bzw. Zellsuspensionen mittels NMR-Technik bestimmt. Diese Methode beruht auf der Verschiedenheit der magnetischen Momente der Kerne von H und D: letzteres beträgt nur 1/3 desjenigen von H.
Da die Intensität des NMR-Signals unter geeigneten Bedingungen umgekehrt proportional zur D_2O-Konzentration ist, läßt sich mittels einer Eichkurve der tatsächliche Gehalt der Lösungen leicht bestimmen (siehe 28, 148).

Eine weitere leicht und schnell durchführbare Methode bietet sich durch Messung der Gefrierpunktserniedrigung von D_2O (28, 272).

Der Gefrierpunkt von Deuteriumoxid (100%) liegt bei 3,802°C. Durch Anwendung eines geeigneten Osmometers läßt sich die durch H_2O hervorgerufene Gefrierpunktserniedrigung leicht feststellen. Dazu ist jedoch ein Gerät erforderlich, dessen Einstellung auf + 3,8°C möglich ist.
Das Prinzip braucht hier nicht erläutert zu werden.
Wir konnten feststellen, daß sich reine H_2O-D_2O-Mischungen im Bereich von 0 - 100% D_2O linear verhalten (siehe Eichkurve, ABB. 33)

Liegen jedoch Pufferlösungen vor, so ist die Salzkonzentration zu berücksichtigen.
Wir bestimmten dazu parallel die Gefrierpunktserniedrigung von Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer in H_2O sowie D_2O. Für die Bestimmung in H_2O ist wegen des niedrigeren Gefrierpunkts von Wasser eine andere Einstellung erforderlich, die jedoch vom Gerät abhängig ist.
Aus einer Vergleichsmessung mit Eichlösung läßt sich somit sofort die Osmolarität in H_2O feststellen.

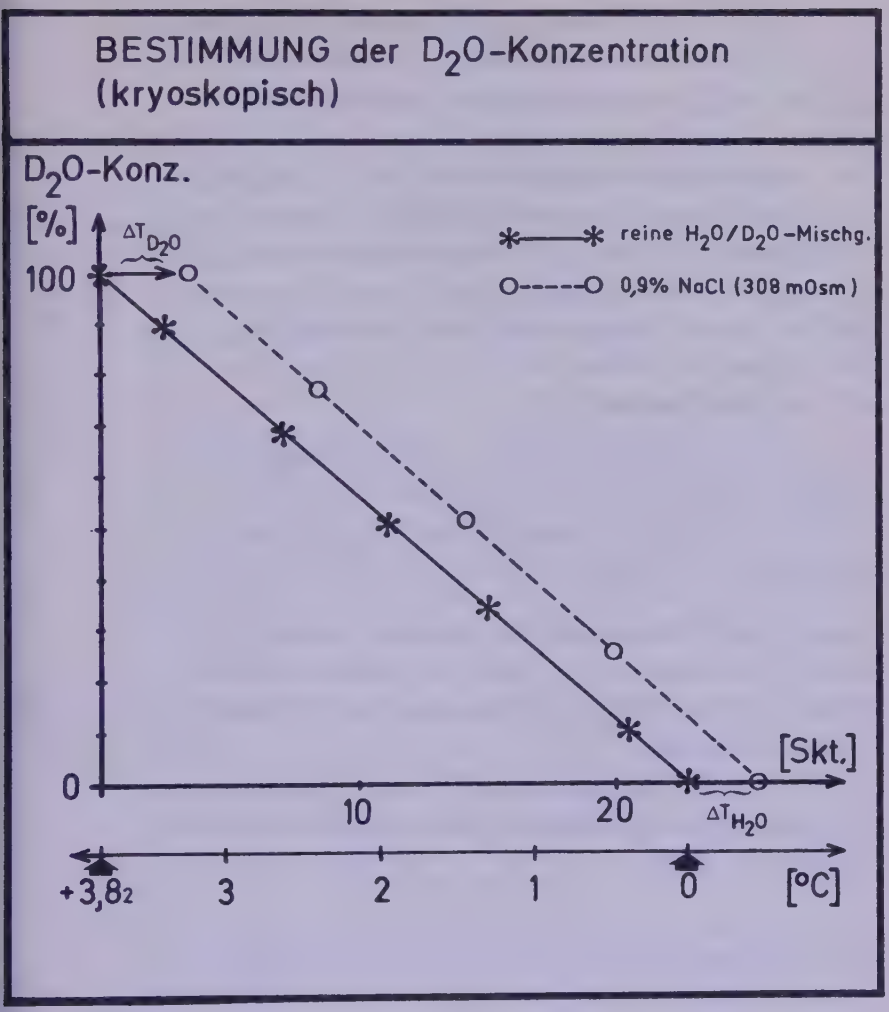


ABB. 33

ΔT = Gefrierpunktserniedrigung (in H_2O bzw. D_2O)

die Pfeile (▲) bezeichnen die Eichpunkte der Kontrolle, den Gefrierpunkt von Wasser (0°) und von D_2O (3,82°C)

Man kann vereinfachend zunächst einmal für beide Lösungsmittel gleiche Salzkonzentrationen voraussetzen, obwohl das streng-genommen für D_2O wegen der geringeren Dissoziation nicht stimmt.
Diese gemessene Gefrierpunktserniedrigung (für H_2O) wird in die Eichkurve eingetragen. Das gleiche macht man mit dem Puffer in D_2O, jedoch mit der für D_2O festgestellten Einstellung. Verbindet man nun beide Punkte, so stellt man ein nur geringes Abweichen von der Parallele zu den reinen Mischungen fest. Liegen dagegen nur verdünnte Gemische von D_2O vor, so wird der Fehler immer geringer.

Das Gleiche läßt sich natürlich auch mit NaCl-Lösungen o.ä. durchführen, deren Konzentration gut bestimmbar ist. Wir konnten dies an der guten Übereinstimmung mit Messungen der kryoskopischen Konstante von D_2O anderer Autoren nachweisen.

Insgesamt bietet diese Methode die Möglichkeit, schnell mit geringem Probevolumen (ca. 0,15ml) eine Aussage über die D_2O-Konzentration zu treffen. Die Genauigkeit war für unsere Versuche hinreichend.
Der Fehler der Methode liegt bei ca. $\pm$ 1 Vol.% D_2O, läßt sich aber möglicherweise nach Untersuchungen anderer Autoren noch verringern (273, 274).

M 6) Bestimmung des ATP-Gehaltes

Bei den von uns untersuchten Tumorzellen handelte es sich um Zellen des Ehrlich-Ascites-Carcinoms, die durch regelmäßige Transplantation auf weiblichen CF 1 Mäusen gehalten wurden. Die Zellen wurden 6 - 9 Tage nach der Transplantation gewonnen, und anschließend nach zweimaligem Waschen in physiologischer NaCl-Lösung oder Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer (pH 7,4) im jeweiligen Inkubationsmedium aufgenommen.

Die Inkubationen erfolgten bei den angeführten Temperaturen in Inkubationsgläschen, die im Warburg-Apparat bewegt wurden. Die Inkubationen wurden durch Einstellen der Gefäße in Eiswasser beendet. Aufschluß bzw. Extraktion der Zellen erfolgte einmal durch Zugabe von 4,00 ml eiskalter Perchlorsäure (0,5 N) zu 1,0 ml Suspension oder zum anderen durch Zugabe der Perchlorsäure zu den abzentrifugierten Zellen. Es ergaben sich hierbei nur geringfügige Unterschiede.
Nach kurzer Zeit wurden die Zellen erneut durchmischt und bei ca. 3000 U/min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch Zugabe von Kaliumcarbonat neutralisiert, das gebildete Kaliumperchlorat abzentrifugiert und der Überstand zur Messung im optischen Test eingesetzt.

Die Bestimmung des ATP-Gehaltes erfolgte mit Hilfe der Biochimica-Test-Combination BOEHRINGER, nach der Methode von BÜCHER (275).

Anm.: Die Inkubationen wurden, falls nichts anderes angegeben, mit ca. 4%igen Zellsuspensionen durchgeführt und zur Vereinheitlichung alle Ergebnisse auf 1%ige Suspensionen umgerechnet.

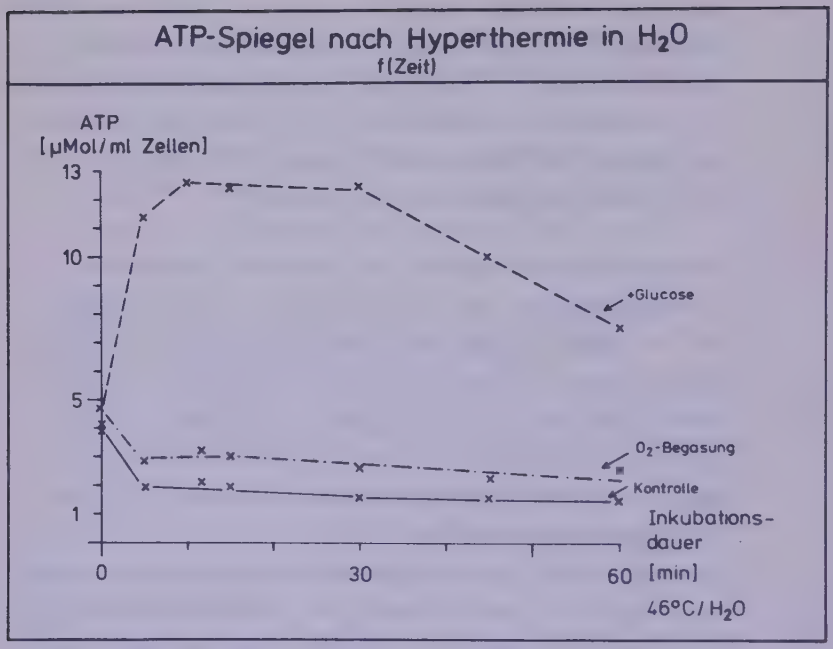


ABBILDUNG 34: ATP-Spiegel (ATZ) nach Hyperthermie in H_2O in Abhängigkeit von unterschiedlicher Vorbehandlung

Inkubationsmedium: K-R-Phosphat-Puffer, pH 7,4 in H_2O
a) Puffer ohne Zusatz (kontrolle)
b) Puffer enthält Glucose - 3,4 mg/ml (ca. 18 mMol)
c) Puffer wurde vor Inkubation ca. 10 Min. mit Sauerstoff begast.
Ein Aliquot (1,0 ml) dieser jeweiligen Zellsuspensionen (ca.4%ig) wurde bei 46°C für die angegebene Zeit hyperthermiert und sofort anschließend die ATP-Konzentration bestimmt (siehe M 6).

(n= 3)

M 7) Bestimmung der Lactat-Konzentration

Ehrlich-Ascites-Tumorzellen (hier abgek. ATZ) wurden am 7. bis 9. Tag nach Inokulation aus der Peritonealflüssigkeit von Albinomäusen (CF 1) gewonnen.
Die entnommene Flüssigkeit wurde mehrfach mit Ca^{2+}-freiem Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer (pH 7,4) gewaschen und schließlich mit dem gleichen Puffer auf ca. 4%ige Suspension verdünnt.

Bei den im experimentellen Teil erwähnten Vorinkubationen wurden die Zellen jeweils in H_2O- oder D_2O-Puffer (90%) bei verschiedenen Temperaturen vorinkubiert bzw. hyperthermiert.

Nach der Vorinkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und in frischem H_2O-Puffer aufgenommen (siehe dazu auch ABB.8).

Die Glykolyseperiode wurde durch Zugabe von Glucose (3,4 mg/ml Suspension) gestartet. Nun wurden die Zellen im Thermostaten bei 38°C eine halbe Stunde unter kontinuierlicher Bewegung inkubiert.

Die Inkubation wurde durch Kälteschock gestoppt.
Unmittelbar danach wurde zu jedem Ansatz (1,0 ml) eiskalte Perchlorsäure (0,6 N) hinzugefügt (2,00 ml). Neutralisation mit Kaliumcarbonat.

Die Bestimmung des Lactat-Gehaltes erfolgte im optischen Test nach HOHORST (275) mittels Boehringer-Testcombinationen.
Die ermittelten Werte wurden auf unsere Versuchsbedingungen umgerechnet.

Anm.: Die Inkubationen wurden, falls nichts anderes angegeben, mit ca. 4%igen Zellsuspensionen durchgeführt und zur Vereinheitlichung alle Ergebnisse auf 1%ige Suspension umgerechnet.

M 8) Bestimmung der Osmolarität der Intraperitonealflüssigkeit (Mäuse)

Zur Kontrolle von Pufferkonzentrationen wurden die Lösungen mittels Gefrierpunktserniedrigung (KNAUER Kryoskopiegerät) bestimmt (siehe M 5).

Dazu wurde das Gerät jeweils mit H_2O bidest. und 0,9% NaCl-Lösung bzw. Eichlösung 400 mOsmol/kg geeicht.

Bei dieser routinemäßigen Kontrolle untersuchten wir auch die Intraperitonealflüssigkeit der Tumormäuse und stellten fest, daß mit zunehmendem Alter des Tumors nach der Transplantation ein starker Anstieg des osmotischen Drucks erfolgte. Serum hat in der Regel 290 Milliosmol/kg. Die Werte der Ascites-Tumormäuse stiegen jedoch von ca. 340 mOsm (6.Tag) auf 394 mOsm (14.Tag nach inoc.).

Wir führen dies vor allem auf ein starkes Anwachsen der Laktatkonzentration zurück, die in der gleichen Zeit von durchschnittlich 1,45 mg/ml auf 1,76 mg/ml zunimmt ($p \sim 0{,}005$).

Da das gebildete Laktat normalerweise auch metabolisiert werden kann, sind die hohen Werte überraschend. Hier besteht möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der vorher beschriebenen erhöhten Glykolysekapazität der Ascites-Tumorzellen mit zunehmendem Alter und unseren hier dargestellten Ergebnissen (siehe auch 3.2.3. Glykolyse!)

Da die genaue Einstellung der Empfindlichkeit von dem benutzten Gerät (Thermistor) abhängig ist, wird hier auf genaue Daten verzichtet.

Die Ergebnisse sind in ABB. 35 dargestellt.

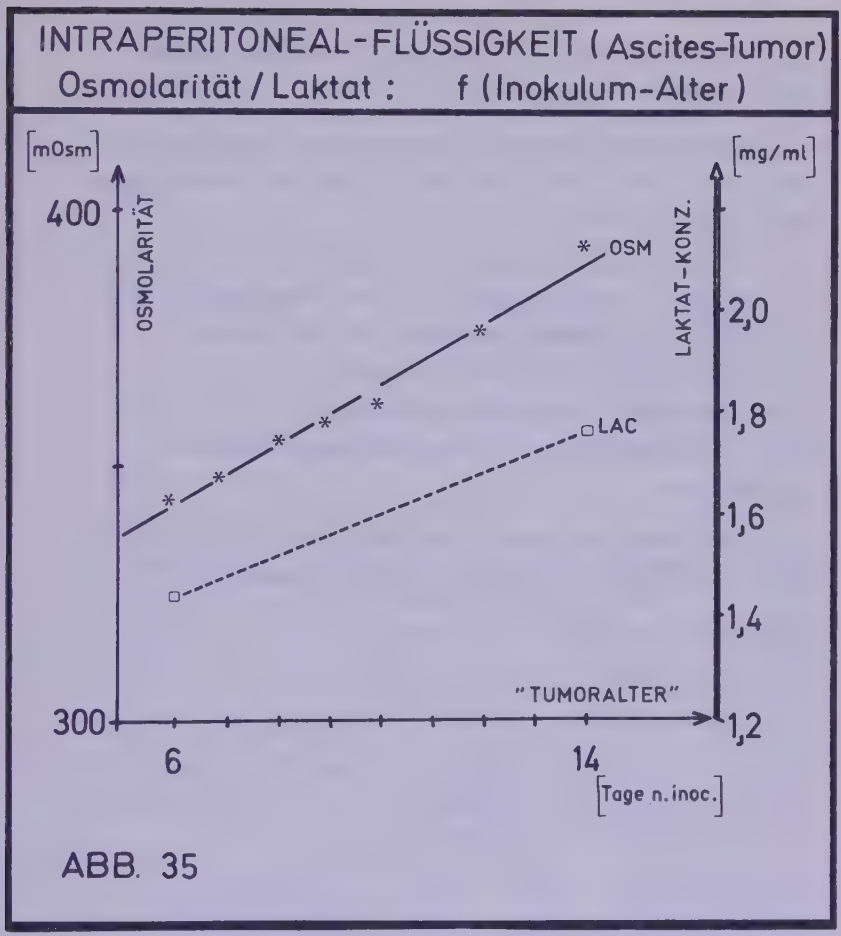


ABBILDUNG 35: Abhängigkeit des osmotischen Drucks und der Laktat-Konzentration beim Ascites-Serum vom Inokulum-Alter

Zu dem in der Abszisse angegebenen Zeitpunkt wurde der getöteten Maus der Ascites-Tumor entnommen und nach Abzentrifugieren der Zellen die Osmolarität des Serums bestimmt (M 8). Gleichzeitig erfolgte die Bestimmung der Laktat-Konzentration im Serum nach HOHORST.

Angegeben sind die Mittelwerte mehrerer Messungen (n= 5).

M 9) Färbeindex der Zellen (Nigrosin-Färbung)

Tumorzellen können mit verschiedenen Farbstoffen angefärbt werden (Trypanblau, Nigrosin usw.).

Wir verwendeten dazu Nigrosin in 0,4%iger Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer-Lösung. Dabei färben sich "tote" Zellen blau, ungeschädigte, "lebende" bleiben farblos.

Die zu zählenden Tumorzellen werden in einer Leukopipette 1:20 mit Puffer (s.o.!) verdünnt. Nach kurzer Zeit der Vermischung der Zellen mit der Farblösung werden einige Tropfen in eine Standard Zählkammer (n. NEUBAUER) überführt.
Nach 2 - 3 Minuten kann die Kammer unter dem Mikroskop ausgezählt werden.

Die auf diese Weise ermittelten angefärbten Zellen wurden zur Gesamtzahl der Zellen ins Verhältnis gesetzt (ausgedrückt in %).

Literatur siehe auch 259!

M 10) Behandlung der Tumorzellen zur elektronenmikroskopischen Untersuchung

(Die Arbeiten wurden im Anatomischen Institut der FU Berlin, Abt.Prof.H.J.Merker ausgeführt)

Nach der Inkubation wurden die Tumorzellen folgendermaßen behandelt:

Zu je 1 ml Zellsuspension wurden ca. 4 ml einer Fixierlösung hinzugefügt, der die Zellen ca. 4 Stunden ausgesetzt waren.

Zusammensetzung: Glutaraldehyd,dest. 3%
p-Formaldehyd 3% in:
0,2 M Kakodylat-Puffer (pH 7,2).

Daran anschließend wurden die Zellen in Puffer-Lösung gewaschen.

Die Nachfixation erfolgte in 1%igem OsO_4 in 0,2 M Natriumkakodylat-Puffer für 1 Stunde.

Erneutes Waschen in Kakodylat-Puffer.

Entwässerung in 50 / 70 / 80 / 90 % Aceton (jeweils 1 Stunde) und anschließend absolutem Aceton (mehrere Stunden).

Behandlung mit Aceton-MICROPAL-Gemisch

3:1 / 1:1 / 1:3 jeweils mindestens 24 Stunden.

Anschließend Einbettung in MICROPAL^R.

Schneiden mit LKB bzw. Reichert-Mikrotom.

Kontrastierung der Schnitte mit Uranylacetat 1% bzw. Bleizitrat nach Reynolds.

Betrachtung bzw. Fotografie mit

SIEMENS Elmiskop I/101.

(Primärvergrösserung von 1000 bis 30.000)

Auswertung 3 1/2-fach auf Vergrößerungspapier

AGFA-GEVAERT FP 1.

M 11) Gefrierkonservierung von Ascites-Tumorzellen

Die Tumorzellen wurden nach der Entnahme (ca. 7.-8.Tag) ohne Waschen vorsichtig in einem Eisbad auf ca. 2°C abgekühlt. Zu der Zellsuspension wurden ca. 10 Vol.% vorher gekühltes DMSO (Dimethylsulfoxid, reinst) hinzugefügt und nach der Vermischung unter Schütteln wurde das Gefäß (Inhalt ca. 2 ml) in Flüssige Luft eingebracht (-196°C).
Der Abkühlungsprozeß wird dann schnell durchlaufen (leichtes Schütteln in der ersten Zeit).
Nach ca. 2 bis 3 Minuten ist die Suspension durchgefroren. Sie wird einige Minuten in der Flüssigen Luft belassen, daran anschließend wurden die Gefäße in eine Gefriertruhe mit einer Temperatur von ca. - 50°C überführt und dort belassen.
Von besonderer Bedeutung ist der Auftau-Vorgang:
Wegen der großen Toxizität von DMSO muß vor Gebrauch die Zellsuspension bei niedriger Temperatur (unter 10°C !) mehrfach mit einem großen Überschuß von NaCl-Lösung oder Puffer ausgewaschen werden, um das DMSO rasch zu entfernen. Dabei sollte die Temperatur möglichst nicht über 4°C steigen, weil mit höherer Temperatur der Grad der Zellschädigung stark zunimmt.

Nach dem Waschen können die Zellen überimpft werden.

Die auf diese Weise behandelten Tumorzellen ließen gegenüber frischen Zellen keine prinzipiellen Unterschiede erkennen.

Die ABB. 36 und 37 zeigen Beispiele für das Erhaltungsbild solcher Zellen (Elektronenmikroskopische Aufnahmen).

Einige Zellen kommen vor, die deutliche Zeichen einer Schädigung tragen. Ihre Zellmembran ist dann fragmentiert, das Cytoplasma hell, die membranbegrenzten Zellorganellen sind geschwollen und der Kern zeigt Pyknose-Erscheinungen sowie eine sog. "Nucleinsäureflucht", d.h. die Chromatin-Menge hat sich verringert.

Der Anteil dieser offenbar durch Mikroeiskristall-Bildung (oder DMSO ?) geschädigten Zellen wechselt von Präparation zu Präparation, beträgt aber im Durchschnitt nur 5%.

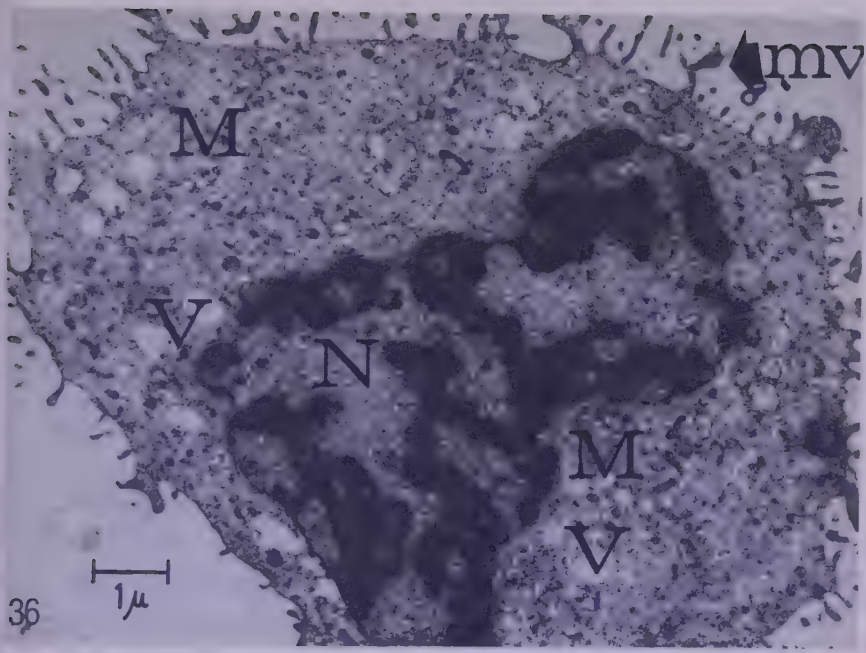
ABB. 36 Ascites-Tumorzelle (Ehrlich)
nach Gefrierkonservierung (siehe M 11)
(Vergrößerung: 9800 x)

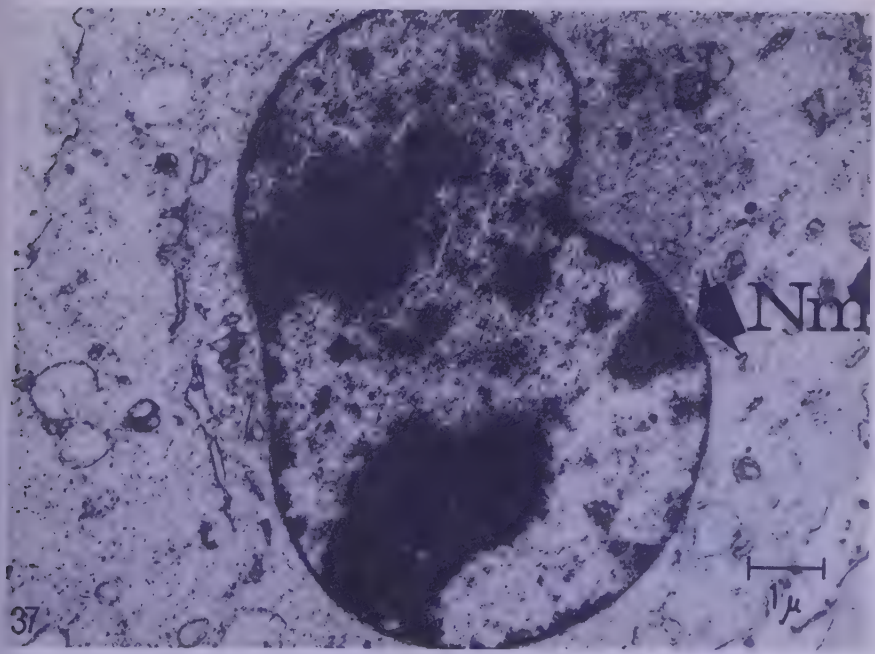
ABB. 37 gleiche Konservierung w.oben
(Vergrößerung: 9800 x)

Beide Fotos zeigen typische Erhaltungsbilder der konservierten Zellen

mv = Microvilli
M = Mitochondrien
V = Vakuolen
N = Nucleus
X = dichte Chromatin-plugs

Nm = (doppelte) Kernmembran


mv
M
V
N
M
V
1µ
36


Nm
1µ
37

6. LITERATUR - REGISTER

Teil A) Spezielle Literatur zum Text

1) Urey,H.C., Brickwedde, F.G., Murphy, G.M. - A Hydrogen of mass 2 Phys.Rev. 39 (1932) 164 Phys.Rev. 40 (1932) 464

2) Lewin, S. - Arch.Biochem.Biophys.115(1966)62

3) Lewin, S. - Proc.Biochem. Soc. 457th Meeting (Febr.1966)

4) Katz, JJ., Crespi, H.L., Finkel, A.J. - Pure appl.Chem. 8 (1964) 471

5) Vasilescu,D., Fianette,C. - Bioch.Biophys.Acta 129 (1966) 417

6) Siegel, F.P., Hiter,F.D., Susina, S.V., Blake,M.I. - J.pharm.Sci. 53 (1964) 978

7) Hüttenrauch, R. - Pharmazie 22 (1967) 531

8) Hüttenrauch, R. - Pharmazie 23 (1968) 284

9) Hüttenrauch,R., Fricke,S. - Pharmazie 28 (1973) 545

10) Krumbiegel,P., Serfas,O. - Arch.Pharm. 299 (1966) 432

11) Lohmann, W. - Strahlentherapie 138 (1966) 739

12) Krumbiegel, P. - Z.Chemie 8 (1968) 328

13) Kirshenbaum, I. - Physical Properties and Analysis of Heavy Water, N.Y. 1951

14) Viallard, R. - Deuterium (noveau Traité de Chimie) Ed. P.Pascal, Paris 1955

15) Viallard, R. - Tables anuelles de constantes et donneés numériques - Deuterium Paris 1937

16) Stoakland,K.,Ronaees,E., Tronstad, L. - Trans.Faraday Soc. 35 (1939) 312

17) Schrader, R., Wirtz, K. - Z.Naturforschung 6a (1951) 220

18) Isberg,P., Lundberg,L. - Z.Naturforschung 9a (1954) 472

19) Urey, H.C., Greiff, L.J. - J.Americ.chem.Soc. 57 (1935) 321
- J.chem.Soc.(London) (1947) 562

20) Libby, W.F. - J.chem.Physics 11 (1943) 101

21) Black, J.F., Taylor, H.S. - J.chem.Physics 11 (1943) 395

22) Bigeleisen, J. - J.chem.Physics 18 (1950) 481

23) Friedmann, A.S.,Haar,L. - J.chem.Physics 22 (1954) 2051

24) Glasoe,P.K., Long,F.A. - J.Phys.Chem. 64 (1960) 188

25) Gold,V., Satchell,D.P.N. - Quart.Reviews 9 (1955) 51

26) Bunton,C.A.,Shiner,V.J. - J.Amer.chem.Soc. 83 (1961) 42

27) Salomaa,P.,Schaleger,L.L. - J.Amer.chem.Soc. 86,1 (1964) 1
Long, F.A.

28) GMELINS Handbuch der anorg. Chemie, 8.Aufl. Nr.3,Lief.6 (1964)

Übersichten:

29) Brodsky, A.E. - Isotopenchemie, Akademie-Verlag, Berlin 1961

30) Halevi, E.A. - Progr.Phys.Org.Chem. 1 (1963) 109

31) Melander, L. - "Isotope effects on Reaction Rates" Ronald Press Comp., N.Y. 1960

32) Simon, H., Palm,D. - Angew.Chemie 78 (1966) 993

33) Ronginski, S.S. - "Theoret.Grundlagen d.Isotopenchemie" Dt.Verlag d.Wiss., Berlin 1962

34) Wiberg, K.B. - Chem.Reviews 55 (1955) 713

35) Saunders, W.H. jr. - "Kinetic Isotope effects"
in:
Weissberger "Technique of Org.Chemistry" VIII/1 (1961)

- Surv.Progr.Chem. 3 (1966) 109

36) Vojta, G. - Theorie d.thermodynamischen Isotopieeffekte
in:
G.Hertz, "Lehrbuch d.Kernphysik" Bd.III, S.88, Verlag Teubner,Leipzig

37) Westheimer, F.H. - Chem.Reviews 61 (1961) 265

38) Baertschi, P. - Z.Naturwiss.med.Grundlagenforschung 2 (1964) 22

39) Bigeleisen, J., Goeppert-Mayer, M. - J.Chem.Physics 15 (1947) 261

40) Weston, R.E., jr. - Ann.Rev.Nucl.Sci. 11 (1961) 439

---

41) Lewis, G.N. - J.Amer.chem.Soc. 55 (1933) 3503

42) Bonhoeffer, K.F., Braun, G.W. - Z.phys.Chemie B 23 (1933) 171

43) Kimball, A.H. - Bibliography of Research on Heavy Hydrogen Compounds New York- London 1949

44) Polanyi, M. - Nature 135 (1935) 19

45) Urey, H.C., Teal,G.K. - Rev.modern Physics 7 (1935) 34

46) Selwood, P.W. - J.chem.Education 18 (1941) 513

47) Erlenmeyer, H., Schoenauer, W., Schwarzenbach, G. - Helv.chim.Acta 20 (1937) 726

48) Ogawa, E. - Bl.chem.Soc.Japan 11 (1936) 425

49) Ingold, C.K.,Wilson,C.L. - Z.Elektrochemie 44 (1938) 62

50) Wolfsberg, M.,Stern,M.J. - Pure appl.Chem. 8 (1964) 225

51) Willi,A.V. - Ber.Bunsenges.phys.Chem. 68(1964)266

52) Halevi, E.A.,Nussim,M. - Bull.Res.Council Israel Sect. A 5 263 (1956)
- J.chem.Soc.(London) (1963) 866

53) Streitwieser, A. jr. - Ann. N.Y.Acad.Sci. 84 (1960) 576

54) Wolfsberg, M. - J.chem.Physics 33 (1960) 2

55) Shiner, V.J.,Kritz,G.S. - J.Amer.chem.Soc. 86 (1964) 2643

56) Brown, H.C.,McDonald,G.J. - J.Amer.chem.Soc. 88 (1966) 2514

57) Bartell, L.S. - J.Amer.chem.Soc. 83 (1961) 3567

58) Simon, H., Dorrer,H.D., Trebst, A. - Z.Naturforschung 19b (1964) 734

59) Katz, J.,Rognstad,R., Kemp, R.G. - J.biol.Chem. 240 (1965) PC 1484

60) Moses,V., Calvin,M. - Biochim.biophys.Acta 33 (1959) 297

61) Hobermann, H.D.,Prosky,L., Hempstead,P.G.,Arfin,H.W. - Biochem.biophys.Res.Comm. 17 (1964) 490

62) Bennett,E.L., Calvin, M., Holm-Hansen,O., Hughes, A.M. - P/843 in A/Conf. 15/1 vol.25 Genf 1958, S.199

63) Katz, J.J., Crespi,H., Finkel,A. - P/860 in A/Conf. 15/1 vol.25 Genf 1958, S. 173

64) Katz, J.J. - Sci.American 203 N 1 (1960) 106
- Ann.N.Y.Acad.Sci. 84, 16 (1960)780

65) Chorney,W., Scully, N.J. Crespi, H., Katz, J.J. - Biochim.biophys.Acta 37 (1960) 280

66) Crespi,H., Archer, A.S., Katz, J.J. - Nature 184 (1959) 730

67) Crespi, H., Con rad,S., Uphaus, R., Katz, J.J. - Ann.N.Y.Acad.Sci. 84 (196o) 648

68) Lester, W., Sung-Huang, Seber, Sun A. - Ann.N.Y.Acad.Sci. 84 (196O) 667

69) Giovanni, R. de - Ann.N.Y.Acad.Sci. ibid. 644

7O) Flaumenhaft,E.,Conrad,S.M.- Katz, J.J. Ann.N.Y.Acad.Sci. ibid. 634

71) Gross,P.,Spindel,W. - Science 131 (196O) 37

72) Gross,P.,Spindel,W. - Ann.N.Y.Acad.Sci. 9O (196O) 5OO

73) Pauling,L.,Corey,R.B., Branson, H.R. - Proc.Natl.Acad.Sci.37 (1951) 205

74) Scheraga, H.A. - Ann.N.Y.Acad.Sci. 84 (196O) 608

75) Printz, M.P.,v.Hippel,P.H. - Proc.Natl.Acad.Sci. 53 (1965) 363

76) Calvin, M., Hermans, J., Scheraga, H.A. - J.Amer.chem.Soc. 81 (1959) 5O48

77) Lewin, S., Munroe,D.P. - Biochim.biophys.Acta 114 (1966) 637

78) Borek, E.,Rittenberg, D., - Proc.Natl.Acad.Sci. 46 (196O) 777

79) Rittenberg, D. - Vortrag frz.physiol.Ges. über Physikochemie u.Isotopentrennung Paris 1962

8O) Roginski, S.S., Schmol, S.E. - Ber.Akad.Wiss. UdSSR 137 (1961)7O6

81) Hvidt, A., Johansen, G., Linderstrøm-Lang, K. - Compt.Rend.Trav.Lab.Carlsberg 29 (1954) 129
29 (1954) 385

Hvidt,A., Linderstrøm-Lang, K. - Compt.Rend.Trav.Lab.Carlsberg 33 (1963) 475

82) Hvidt, A. - Compt.Rend.Trav.Lab.Carlsberg 34 (1964) 299

83) Hvidt,A., Nielsen,S.O. - Advan.Prot.Chem. 21 (1966) 287

84) Haggis, G.H. - Biochim.biophys.Acta 19 (1956) 545

85) Hvidt,A., Linderstrøm-Lang, K. - Biochim.biophys.Acta 18 (1955) 308

86) Lenormant, H., Blout, E.R. - Nature 172 (1953) 77O

87) Krause, I.M., Linderstrøm-Lang, K. - Compt.Rend.Trav.Lab.Carlsberg 29 (1955) 367

88) Bryan, W.P., Nielsen, S.O. - Biochemistry 8 (1969) 2572

89) Tomita, K., Rich, A., de Loze, C., Blout, E.R. - J.Mol.Biol. 4 (1962) 83

90) Evdoklimov, Sh. - Bioenerg.Biolog.Spektrofotom., Dokl.IV, SSSR 1965 (1967) 195

91) Klotz, I.M. - J.Colloid Interface Sci. 27 (1968) 804

92) Katz, J.J., Crespi, H.L., Hasterlink, R.J., Thomson, J.F. Finkel, A.J. - J.Nat.Canc. Inst. 18 (1957) 641

93) Gordon, S., McDowell, W.R., Hart, E.J. - Nuclear Engineering and Science Congress No.141, Cleveland 1955

94) Hart, E.J., McDowell, W.R. Gordon, S. - Proc.Internat.Conf.Peaceful Uses of Atomic Energy, Genf 7 (1955) 593

95) Tao, M., Gordon, M.P., Nester, E.W. - Biochemistry 5, 3 (1966) 4146

96) Rigby, B.J. - Biochim.biophys.Acta 62 (1962) 183

97) Harrington, G., von Hippel, K. - Arch.Biochem.Biophys. 92 (1961) 100

98) Deschtscherevski, V.I., Korniyenko, I.A. - Biofizika 9 (1964) 315

99) Deschtscherevski, V.I. - "Effect of isotope composition of water" Diplomarbeit, Univ. Moskau 1963

100) Deschtscherevski, V.I. - Biofizika 10 No.4 (1965) 708

101) Alexandrov, V.Y., Arronet, N.I., Den'Ko, Y.I., Konstantinova, M.F. - Cytologija 6 No.6 (1964) 667

102) Den'Ko, E.I. - Cytologija 9 No.8 (1967) 940

103) Marsland, D., Zimmermann, A. - Exp.Cell Research 38 (1965) 306

104) Kaminer, B. - Nature 209 (1966) 809

105) Bray, D.A., Thomson, J.F. - Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 111 (1962) 380

106) Dicken, C., Henderson, T.R., Dinning, J.S. - Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 110 (1962) 208

107) Wilson, J.C., Dinning, J.S. - Biochim.biophys.Acta 53 (1961) 223

ENZYME

108) Kauzmann, W. - Advan.Prot.Chem. 14 (1959) 1

109) Linderstrøm-Lang, K.U. - Proteins and Enzymes, Lane Memorial Lectures 54, Stanford Univ.Press (1952) USA

- Chemical Soc.(London) Spec.Publ. No. 2 (1955)

110) Kushner, W.P.,Frenkel,S.Y.- Dokl.Akad.Nauk. SSSR 141 (1961)481

111) Foss, J.G. - Biochem.biophys.Res.Comm. 2 (1961) 193

- Biochim.biophys.Acta 74(1961) 569
- Biochim.biophys.Acta 79(1964) 41

112) Weber, R.E. - unveröff., vgl. Tanford, C. (1961) Physical Chemistry of Macromolecules, J.Wiley + Sons Inc., N.Y.

113) Scheraga, H.A., Laskowski, M. jr. - Adv.Protein Chem. 12 (1957) 1

114) Elödi, P., Jecsai, G. - Acta Physiol.Acad.Sci. Hung. 17 (1960) 175

115) Elödi, P. - Akad.Kiado, Budapest (1965) ung.

116) Hvidt, A. - Biochim.biophys.Acta 18 (1955) 306

117) Markus, G., Love, R.L., Wissler, F.C. - J.Biol.Chemistry 239 (1964) 3687

118) Meyer, M.L., Kauzmann, W. - Arch.Biochem.Biophys. 99 (1962) 348

119) Steven, T.S., Tristamm, G.R. - Biochem. J. 73 (1959) 86

120) Leonard, W.J.,Foster,J.F. - J.Biol.Chem. 236 (1961) 2662

- J.Biol.Chem. 236 (1961) PC 73

121) Hvidt, A., Kägi,J.H.R. - Compt.Rend.Lab.Carlsberg 33 (1963) 497

122) Di Sabato, G., Ottesen, M. - Biochemistry 4 (1965) 422

123) Zimmermann, E. - Biochem.Z. 341 (1965) 129

124) Apella, E.,Markert,C.J. - Biochem.Biophys.Res.Comm. 6 (1961) 171

125) Jaenike, R. - Biochim.biophys.Acta 85 (1964) 186

126) Deal, W.C., Rutter,W.J., Massey,V., Van Holde, K.E. - Biochem.Biophys.Res.Comm. 10 (1962) 49

127) Millar, D.V.S. - J.Biol.Chem. 237 (1962) 2135

128) Pfleiderer, G.,Jeckel,D., Wieland, Th. - Biochem. Z. 329 (1957) 104

129) Dube, S.K.,Roholt, O., Pressmann, D.. - J.Biol.Chemistry 238 (1963) 616

130) Di Sabato, G., Kaplan, N.O. - J.Biol.Chemistry 239 (1964) 438
- J.Biol.Chemistry 240 (1965) 1072

131) Chilson, O.P.,Kitto,G.B., Kaplan, N.O. - Proc.Nat.Acad.Sci.US 53 (1965) 1006

132) Südi, J. - Biochim.biophys.Acta 212 (1970) 213

133) Vesell, E.S., Yielding,K.L. - Proc.Nat.Acad.Sci. US 56 (1966) 1317

134) Chilson, O.P.,Kitto,G.B., Pudles, J., Kaplan,N.O. - J.Biol.Chemistry 241 (1966) 2431

135) Mikkelsen, K.,Nielsen,S.O. - J.Phys.Chem. 64 (1960) 632

136) Hermans, J., Scheraga, H.A. - Biochim.biophys.Acta 36 (1959) 534

137) Kurganov, B.J., Agatova, A.J. - Biofizika 10 (1965) 755

138) Eyring, H. + E.M. - Modern chemical kinetics Reinhold, N.Y. 1963

139) Laidler, K.J. , Bunting, P.S. - The chemical kinetics of Enzyme Action, Clarendon Press Oxford 1973

14o) McKay, R.H., Kaplan, N.O. - Biochim.biophys.Acta 79 (1964) 273

141) DiSabato, G., Kaplan, N.O. - J.Biol.Chemistry 240 (1965) 1072

142) Apella, E., Markert,C.J. - s. 124)

143) Pfleiderer, G. - s. 128)

144) Pfleiderer,G., Jeckel,D., Wieland, Th. - Arch.Biochem.Biophys. 83 (1959) 275

145) Plummer, D.T., Wilkinson, J.H., Withycombe, W.A. - Proc.Biochem.Soc. in: Biochem.J.. 89 (1963) 48 P

146) siehe GMELIN (Nr. 28) Seite 1973

147) Everse, J., Kaplan, N.O. - Advances in Enzymology 37 (1973) 61 - 133

TUMOREN und ZELLEN

148) Meyer, F. - Untersuchungen z.Stabilität biolog. Strukturen durch Schweres Wasser Dissertation FU Berlin 1973

149) Tower, D. + D.A. - Biochem.Pharmacol. 19 (1970) 1015

150) Katz, J.J., Crespi, H.L., Czajka, D.M., Finkel,A.J. - Amer.J.Physiol. 203 (1962) 907

151) Czajka, D.M., Finkel, A.J., Fisher, C.S., Katz, J.J. - Amer.J.Physiol. 201 (1961) 357

152) Von Hevesy, G.,Hofer,E. - Klin.Wochenschrift 13 (1934) 1524

153) Pinson, E.A., Langham,W.H. - J.Appl.Physiology 10 (1957) 108

154) Thompson, R.C., Ballou, J.E. - J.Biol.Chem. 223 (1956) 795

155) Hattori, A.,Crespi,H.L., Katz, J.J. - unpl.results (1964) siehe: Int.Rev.Cytology 18 (1965) 313

156) Løvtrup, S. - J.Theoret.Biol. 5 (1963) 341

157) Rastogi, R.P., Skugla,P.C., Yadava, B. - Biochim.biophys.Acta 249 (1971) 454

158) Lifson, N., Gruman, L.M., Levitt, D.G. - Amer.J.Physiology 215 (1968) 444

159) Wang, J.H., Robinson,C.V., Edelman, E.S. - J.Amer.chem.Soc. 75 (1953) 466

160) Weigl, J. - Z.Naturforschung 22b (1967) 885

161) Gross, P.R.,Spindel,W., Cousineau, G.H. - Pure Appl.Chem. 8 (1964) 483

- Biochem.Biophys. Res.Comm. 13 (1963) 405

162) Gross, P.R., Harding,C.V. - Science 133 (1961) 1131

163) Bal, A.K., Gross, P.R. - J.Cell Biology 23 (1964) 188

164) Fischer, A. - Protoplasma 26 (1936) 51

165) Cagianut, B. - Experientia 5 (1949) 48

166) Siegel, B.V., Lund,R.O. Wellings, S.R., Bostic,W.L. - Exp.Cell Res. 19 (1960) 187

167) Manson, L.A., Carp, R.I., Hartzell, R.W., Kritchevsky, D. - Proc.Soc.Exp.Biol.Med.(PSEBM) 105 (1960) 481

168) Manson, L.A., Carp, R.I., Defendi, V., Rothstein,E.L., Hartzell,R.W., Kritchevsky - Ann.N.Y.Acad.Sci. 84 (1960) 685

169) Krug, H., Hübner, G., Hambsch, K., Ludewig,R. - Experientia 22 (1966) 683

170) Rothstein,E.L., Hartzell,R. Manson, L.A., Kritchevsky, D. - Ann.N.Y.Acad.Sci. 84 (1960) 721

171) Thomson, J.F., Klipfel, L.J. - Bioch.Pharmacology 3 (1960) 283

172) Bray, D.A. - Am.J.Physiology 210 (1966) 619

173) Katz, J.J., Crespi,H.L., Hasterlik, W.,Thomson,J.F., Finkel, A.J. - J.Nat.Cancer Inst. 18 (1957) 641

174) Kritchevsky, D. - Ann.N.Y.Acad.Sci. 84 (1960) 573

175) Finkel, A.J., Czajka,D.M. - ibid. 84 (1960) 755

176) Finkel,A.J., Czajka, D.M., Katz, J.J. - Unio int.contra cancrum, Acta (Louvain) 20 (1964) 201

HYPERTHERMIE

177) Vollmar, H. - Z.Krebsforschung 51 (1941) 71

178) v.Ardenne, M. - Grundlagen der Krebs-Mehrschritt-Therapie, VEB V.Volk u.Gesundh. Berlin 1967

a) v.Ardenne,M., Reitnauer,P.G. Z.Naturforschung 21b (1966) 841

179) Westermark, N. - Scand.Arch.Physiol. 52 (1927) 257

180) Friedgood, H.B. - Arch.exp.Zellforschung 7 (1928) 243

181) Belehradek, J. - Temperature and living matter Bornträger-V., Berlin 1935

182) Willheim, R.,Stern,K. - Die Wege u.Ergebnisse chem. Krebsforschung, Wien 1936

183) Hoffmann, M. - Arch.Geschwulstforschg 6 (1953) 186
- ibid. 8 (1955) 20

184) Lyman, C.P., Fawcett,D.W.- Cancer Res. 14 (1954) 25

185) Lampert, H. - in: Körpereig.Abwehr u.bösartige Geschwülste, K.Haug-Verlag, Ulm (1957) S. 9

186) Selawry, O.S.,Goldstein,M.- Cancer Res. 17 (1957) 785
McCornick, T.

187) Auersperg, N. - Nature (London) 209 (1966) 415

188) Auersperg, N., - J.Natl.Cancer Inst.
Hawryluk, A. 28 (1962) 605

189) Fekete,I., Szabò, P. - Naturwiss. 17 (1962) 400

190) Schramm, T., Bender,E. - Acta biol.med.german. 16 (1966) K 17

a) Schramm, T., Bender,E. - ibid. 17 (1966) 527

191) Wüst,G.P., Norpoth,K., - Z.Krebsforschung 79 (1973) 193
Wittig,U., Oberwittler, W.

192) Suzuki, K. - Nagoya J.Med.Sci. 30 (1967) 1

193) Chen, T.T., Heidelberger,C. - Intern.J.Cancer 4 (1969) 166

194) Schrek, R. - Lancet 2 (1965) 1020

195) Schrek, R. - J.Natl.Cancer Inst. 37 (1966) 649

196) Giovanella, B.C., - Proc.Amer.Assoc.Cancer Res.
Heidelberger, C. 9 (1968) 24

197) Giovanella,B.C., Mosti,R. - ibid. 10 (1969) 29
Heidelberger, C.

198) Mondovi, B., Strom, R., - Europ.J.Cancer 5 (1969) 129
Rotilio, G.,
Finazzi-Agro, A.,
Cavaliere, R.,
Rossi-Fanelli, A.

199) Mondovi,B.,Finazzi-Agro,A.,- Europ.J.Cancer 5 (1969) 137
Rotilio,G., Strom, R.,
Moricca,G., Rossi-Fanelli - Ital.J.Biochem. 17 (1968) 101

200) Turano, C., Ferraro, A., - Europ.J. Cancer 6 (1970) 67
Strom,R., Cavaliere, R.,
Rossi-Fanelli, A.

201) Strom,R., Santoro,A.S., - Europ.J.Cancer 9 (1973) 103
Crifo,C., Bozzi,A.,
Mondovi,B., Rossi-Fanelli,A.

202) Warocquier, R., Scherrer, K. - Europ.J.Biochem. 10 (1969) 362

203) Goetze, O. - Langenbecks Arch.Klin. Chir. 152 (1928) 49

204) Goetze,O., Schmidt, K.H. - Dt. Z.Chirurgie 234 (1931) 625

205) Warren, S.L. - Amer.J.Roentgenol. 33 (1935) 75

206) Crile, G. jr. - Ann. Surg. 156 (1962) 404

207) Kirsch, R., Schmidt, D. - in: Aktuelle Probleme aus dem Gebiet der Cancerologie Springer-V., Berlin 1966, S. 53 ff.

208) Kirsch, R., Schmidt, D. - Zentr.Chirurg. 91 (1966) 1297

209) Cavaliere,R.,Ciocatto,E., Giovanella,B.C., Heidelberger, C., Johnson, R., Margottino, M., Mondovi, B.,Moricca,G., Rossi-Fanelli, A. - Cancer 20 (1967) 1351

- Rend.Accad.Naz.Lincei 42 (1967) 164

210) Stehlin, J.S. - Surg.Gynecol.Obstet. 129 (1969) 305

211) Schmähl, D., Nöring, L. - Z.Krebsforschung 69 (1967) 335

212) Schmidt, D., Haym,J. - Arzneimittel-Forschung 18 (1968) 821

213) Tschöpel, L., Kampf,G. - Acta biol.med.german. 20 (1968) 863

214) Warburg, O., Gawehn,K., Geissler, A.W. - Z.Naturforschung 13b (1958) 587

215) Dulbecco, R., Vogt, M. - J.Exp. Med. 99 (1954) 167

216) Yougner, J.S. - J.Soc.Proc.Exp.Biol.Med. 85 (1954) 202

217) Easty, G.C., Mutolo, V. - Exp.Cell Research 21 (1960) 374

218) Laws, J.O., Stickland, L.H. - Exp. Cell Research 24 (1961) 240

219) Günther, Th., Goecke,C. - Z.Naturforschung 21 b (1966) 1171

220) Laser, H., Slater, E.C. - Nature 187 (1960) 1115

221) Mißbach, D., Jung,K., Hübner,G. - Abh.dt.Akad.Wiss. Berlin, Kl.Chemie 1964 (1965) 541

222) Baum, H., Rieske, J.S. - Biochem.Biophys.Res.Comm. 24 (1966) 1

223) Tyler, D.D., Estabrook, R.W.J. - Biol.Chem. 241 (1966) 1672

224) Zahner, R. - Vom Wasser 29 (1962) 142

225) Lindahl, P.E., Schwahnbaohm, E. - Oikos (Kopenh.) 22 (1971) 210

226) Haeser, P.E., Lehr, E., Werner, E. - Naturwiss. 3 (1972) 123

227) Wenzel, M., Stöhr,W. - Hoppe-Seyler's Z.Phys.Chemie 351 (1970) 737

228) Kaltenbach, J.P. + M.H. - Ann.N.Y.Acad.Sci. 63 (1956) 977

229) Zajicek, G., Bernstein, N., Rosin, A., Gross, J. - Exp.Cell Res. 31 (1963) 390

230) Oelkers, W. - Z.Naturforschung 21b (1966) 980

231) Ebstein, B.S., Samuel, D. - J.Neurochemistry 18 (1971) 1597

232) Thomson, J.F., Klipfel, F.J. - Amer.J.Physiology 197 (1959) 1128

233) Quastel, J.H., Bickis,I.J. - Nature 183 (1959) 281

234) Liss, E. - Z.Klin.Chemie 3 (1965) 206 d

235) Terranova, T., Feo, F., Gravela, E., Gabriel, L. - Z.Krebsforschung 66 (1964) 41

236) Williams, A.M., Finlayson, J.S., Tews,J.K. - Bioch.Biophys.Acta 74 (1963) 24

237) Ellis, D.B., Scholefield, P.G. - Can.J.Biochem.Physiol. 40 (1962) 343

238) Poole, D.T. - J.Biol.Chem. 242 (1967) 3731

Poole, D.T., Butler,T.C., Waddell, W.J. - J.Nat.Cancer Inst. 32 (1964) 939

Poole, D.T., Butler, T.C. - J.Nat.Cancer Inst. 42 (1969) 1027

239) Brandts, J.F., Broom, B. in: - Rose,A.H.: Thermobiology, Academic Press, London 1967

240) Drost-Hansen, W. in: - Chemistry of the Cell-Interface, Ed. H.D.Brown, Academic Press, London 1971,S.154

241) Bickis, I.J.,Quastel,J.H. - Nature 205 (1965) 44

242) Eagle, H., Barban, S., Levy, M., Schulze, H.O. - J.Biol.Chem. 233 (1958) 551

243) Rueckert, R., Mueller,C.G. - Proc.Amer.Ass.Cancer Res. 2 (1958) 340

244) Graff, S., Moser, H., Kastner, O., Graff,A.M., Tannenbaum, M. - J.Nat.Cancer Inst. 33 (1965) 511

245) Lettré, H. - Ärztl.Sammelbl. 49 (1960) 111

246) Warburg, O. - Über den Stoffwechsel v.Tumoren, Springer V., Berlin 1926
- On the origin of cancer cells, Science 123 (1956) 309

247) Kunz, W., Schmid, W. - Z.Naturforschung 12b (1957) 743

248) Holzer, H., Haan, J., Pette, D. - Biochem.Z. 327 (1955) 195

249) Krause, H.P., Probst,H., Schneider, F. - Z.Naturforschung 26b (1971) 780

a) Krause, H.P., Schneider,F. - Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 354 (1973) 628

250) Cairns, J., Denhardt, D.T. - J.Molecular Biol. 36 (1968) 335

251) Muraoka, S., Slater, E.C. - Bioch.Biophys.Acta 162 (1968) 170

252) Burk, D., Schade, A.L. - Science 124 (1956) 270

253) Weinhouse, S. - Science 124 (1956) 267

254) Lettré, H. - Wiener Med. Wochenschrift 108 (1958) 791

255) Rapoport, S., Nierath-Hiebsch, C.H., Thamm, R. - Acta biol.med.german. 21 (1968) 291

256) v.Ardenne, M., Reitnauer, P.G. - Arch.Geschwulstforschung 26 (1966) 184

257) Burk, D., Woods, M., Howard, T. - Fed. Proc. March 1966

258) Schrek, R. - Arch. Pathology 37 (1944) 319

259) Kaltenbach, J.P. + M.H., Lyons, W.P. - Exp.Cell Res. 15 (1958) 112

260) Selby, C.C., Biesele,J.J., Grey, C.E. - Ann.N.Y.Acad.Sci. 63 (1956) 748

261) Niklowitz, W. - Z.Naturforschung 13b (1958) 454

262) Spyropoulos, C.S., Ezzy, M.E. - Amer.J.Physiol. 197 (1959) 808

263) Garby, L., Nordquist,P. - Acta phys.Scandinav. 34 (1955) 162

264) Thies, R.E., Carlson, D. - Biol. Bull. 110 (1956) 295

265) Kaminer, B., Kimura, J. - Science 176 (1972) 406

266) Müller-Mohnssen, H., Albrecht-Bühler, G. - Pflügers Archiv 305 (1969) 65

267) Pütter, J. - Arzneimittel-Forschung 10 (1960) 8

- Symposien aktueller therapeutischer Probleme, Heft 3 Enke-V., Stuttgart 1960

268) Pütter, J. in: - Therapie maligner Tumoren, Herausg. F. Meythaler, Enke-V., Stuttgart 1966, Bd. I

269) Bottini, A.T., Roberts, J.D. - J.Amer.chem.Soc. 80 (1958) 5203

MATERIAL u. METHODEN

270) Wegner, L.A., Winkelmann, H. - Atompraxis 16 (1970) 1

271) Süß, R., Volm, M. - Naturwiss. 55 (1968) 134

272) Reaser, P.B., Burch, G.E. - Science 128 (1958) 415

273) Graystone, J., Seitchik, J., Milch, R., Shulman, G.P., Cheek, D.B. - J.Lab.Clin.Med. 69 (1967) 885

274) Garry, P.J., Nelsen, C.E., Owen, G.M. - J.Lab.Clin.Med. 71 (1968) 709

275) Bücher, Th. - Bioch.biophys.Acta 1 (1947) 292

276) Hohorst, H.J. in: - H.U.Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie,Weinheim 3.Aufl. 1974, Bd.II

277) Wroblewski, F., La Due, J.S. - Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 90 (1955) 210

Teil B) Weitere Literatur- Biologische Effekte von D_2O

ältere Literatur (1933 - 1955) -

Barbour, H.G., - Effects of Heavy Water on mammalian metabolism
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 32 (1935) 1365

- Yale J.Biol.Med. 9 (1937) 551

Barbour,H.G., Bagdanovitch,S.B. - The pharmacological action of Deuteriumoxid: Evidence from fish melabophores for sympathomimetic action -
J.Pharmacol.Exp.Therap. 61 (1937) 148

Barbour,H.G., Allen, E. - Tumor-Growth in Mice one-fifth satured with D_2O
Amer. J.Cancer 32 (1938) 440

Barbour,H.G., Herrmann,J. - The sympathomimetic action of D_2O on mice
J.Pharmacol.Exp.Therap. 62 (1938) 158

Barbour, H.G., Rice, L.E. - Stimulation of metabolism in mice by continued administration of 40% Deuteriumoxid
ibid. 60 (1937) 97

Barbour,H.G., Trace,J. - Toxicity and symptoms, metabolic rate, water exchanges of D_2O
ibid. 58 (1936) 460

Barnes, T.C. - A physiological effect of heavy isotope of hydrogen in water-
J.Amer.Chem.Soc. 55 (1933) 4332

Barnes, T.C. - The effect of h.w.of low concentration on Euglena
Science 79 (1934) 370

Barnes, T.C., Gaw, H.Z. - The chemical basis for some biological effects of heavy water
J.Amer.Chem.Soc. 57 (1935) 590

Barnes, T.C., Larson, E.J. - The influence of h.w. of low concentration on Spirogyra, Planaria and enzyme action
Protoplasma 22 (1934) 431

Barnes, T.C., Warren, J. - The heart-rate in heavy water
Science 81 (1935) 346

Brandt, W. - Die Glykolyse unter dem Einfluß von D_2O
Kl.Wochenschrift 41 (1935) 1453

Brandt, W. - Der Einfluß von D_2O auf die Aktion des isolierten überlebenden Froschherzens
Kl. Wochenschrift 45 (1935) 1597

Brooks, S.C. - The permeability of erythrocytes to deuterium ox.
J.Cell Comp.Physiol. 7 (1935) 163

Chance, H.L., Allen, W.C. - The influence of h.w. on Growth, Morphology, and Fermentation reactions of Eberthella typhosa
J.Bacteriol. 51 (1946) 547

Craig, F.N., Trelease, S.F. - Photosynthesis of Chlorella in heavy water
Amer.J.Botany 24 (1937) 232

Curry,J., Pratt,S., Trelease, S.F. - Does dilute Heavy Water influence biological processes?
Science 81 (1935) 275

Delamater, A.J. - Effects of h.w. upon the fission rate and life-cycle of the ciliate Uroleptus mobilis
Biol.Bull. 71 (1936) 199

Dybing, O., Guldberg,G.-Hansen, K. - Patholog.-anatomische Veränderungen bei subakuter D_2O-Vergiftung von Mäusen
Kl.Wochenschrift 45 (1938) 1585

Ewart, A.J. - The influence of. H.W. on plants
Aus.J.Biol.Med.Sci. 13 (1935) 9

Fox, D.L., Cupp,E.E., - McEwen, G.W. - Low concentrations of deuterium-oxide and growth of marine diatoms
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 34 (1936) 575

Hansen, K. Blegen, E. - Kl.Wochenschrift 42 (1935) 1113

Hansen, K., Rustung, E. - Untersuchungen über die biologischen Wirkungen v.Schwerem Wasser bei warmblütigen Tieren
Kl.Wochenschrift 42 (1935) 1489
ibid. 43 (1935) 1521

Harvey, E.N. - Biological effects of Heavy Water
Biol. Bull. 66 (1934) 91

v.Hevesy, G. - Das Schwere Wasser in der Biologie
Naturwiss. 23 (1935) 775

v.Hevesy, G., Hofer,E.- Diplogenand fish
Nature 133 (1934) 495

Korgh, A., Ussing, H.H. - A note on the permeability of trout eggs to D_2O and H_2O
Exp.Biol. 14 (1937) 35

Lewis, G.N. - The biology of Heavy Water
Science 79 (1934) 151

Lucké, B., Harvey, E.N. - The permeability of living cells to heavy water
J.Cell Comp.Physiol. 5 (1935) 473

Mayer, S.L. - Deuteriumoxide and Aspergillus
Science 79 (1934) 210

Meyer, H. - Die Züchtung einer Alge in hochkonzentriertem schwerem Wasser
Naturwiss. 24 (1936) 346

Morowitz, H.J., Brown, L.M. - Biological effects of deuterium compounds
US Natl.Bureau of Standards Rep. 2179 (1953) 49

Parpart, A.K. - The permeability of the mammalian erythrocytes to Heavy Water
J.Cell Comp.Physiol. 7 (1935) 153

Pratt, R. - Influence of D_2O on the growth of Chlorella vulg.
Amer.J.Botany 25 (1938) 699

Pratt, R., Curry, J. - Growth of roots in Deuteriumoxide
Amer.J.Botany 24 (1937) 412

- Growth of germ tubes of Erysiphe: Spores in Deuteriumoxide
ibid. 23 (1936) 422

Prescott, D.M. - Effect of activation on the water permeability of salmon eggs
J.Cell Comp.Physiol. 45 (1955) 1

Richards, O.W. - The growth of yeast in water containing deuterium
Amer.J.Botany 20 (1933) 679

Richards, O.W. - The effect of deuterium on the growth of yeast
J.Bact. 28 (1934) 289

Shoup, G.S., Meyer, S.L. - The action of deuteriumoxide in low concentrations on the course of gas production by Brewers yeast
J.Tenn. Acad.Sci. 10 (1935) 127

Taylor, H.S. - Research on Heavy Hydrogen at Princeton
Science 79 (1934) 303

Taylor, G.W., Harvey, E.N. - Respiration of yeast in water containing D_2O
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 31 (1934)954

Taylor, G.W., Swingle, W.W., Eyring,H., Frost,A.A. - The effect of water containing the isotope of hydrogen upon freshwater organisms
J.Cell Comp.Physiol. 4 (1933) 1

Thorn, M.B. - Studies on the enzymatic oxydation of Succinic Acid containing D in the Methylene Groups
Biochem. J. 49 (1951) 602

Ussing, H.H. - The influence of h.w.on the development of amphibian eggs
Skand.Arch.Physiol. 72 (1935) 192

Weiser, H.H. - Influence of deuteriumoxide on growth and morphology of Lactobacilli
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 36 (1937) 151

Polykov, Y.A. - The Possibility of Toxic Activity of Heavy Water on Agricultural Crops
Pochvovedenie 7 (1953) 25 russ.

wichtige Übersicht:

Schoenheimer, R. Rittenberg, D. - Physiol.Rev. 20 (1940) 218-248

Neuere Literatur (1956 - heute) -

ÜBERSICHTEN

Thomson, J.F. - "Biological Effects of Deuterium" Pergamon Press, New York , 1963

Katz,J.J., Crespi,H.L.- Blake, N. - Isotopes in Experimental Pharmacology, L.J.Roth Edit., University of Chicago Pr., 1965, S. 455

Flaumenhaft,E., Bose,S., Crespi,H.L. Katz, JJ. - Deuterium-Isotopeeffects in Cytology Int.Rev.Cytology 18 (1965) 313

Katz, J.J.,Crespi,H.L.- Deuterated Organisms: Cultivation and Uses, Science 151 (1966) 1187

Wirkung auf Microorganismen

de Giovanni, R. , Zamenhof, S. - The effect of D_2O on Escherichia coli Records Genetic Soc.Amer. 28 (1959) 65

Crespi,H.L., Archer, S.M.,Katz,J.J. - Culture of Algae and other Micro-organisms in Deuterium oxide Nature 184 (1959) 729

Strain, H.H., Crespi, H.L.,Katz,JJ. - Chloroplast pigments of Deuterated Green Algae, Nature 184 (1959) 730

Rothstein,E.L., Manson,L.A.,, Hartzell, R. jun., Kritchevsky, D. - Effects of D_2O on the Synthesis of T 5 and T 7 Bacteriophages Nature 184 (1959) 1167

Bruce, V.G., Pittendrigh, C.S. - Wirkung v.Schwerem Wasser auf die Phase und Periode des Tagesrhythmus v.Euglena J.Cellular comparat.Phys. 56 (1960) 25

de Giovanni, R. - Die Wirkung v. D_2O auf bestimmte Mikro-organismen Ann.N.Y.Acad.Sci. 84 (1960) 644

de Giovanni, R. - The Effect of D_2O on Bacteria
Z.Vererbungslehre 92 (1961) 389

de Giovanni, R., Zamenhof, S. - Studies on Incorporation of Deuterium into Bacteria
Biochem. J. 87 (1963) 79

O'Brien, R.T. - Relationship between Deuterium Inhibition of Growth and Glucose Catabolism in Saccharomyces cerevisiae
P.S.E.B.M. 112 (1963) 186

Lovett, S. - Effect of Deuterium on Starving Bacteria
Nature 203 (1964) 429

Mandeville, S.E., Crespi, Katz - Fully Deuterated Euglena gracilis
Science 146 (1964) 769

Carp, R., Kritchevsky, D. - Einfluß v. D_2O auf die Plaque-Form des Pferdeenzephalomyelitis-Virus (Weststamm)
Nature 208 (1965) 93

Jung,K., Hübner, G. - Zum Einfluß v.Schwerem Wasser auf die Vitalität von Sacch.cerevisiae
Abh.dt.Akad.Wiss. (Berlin), Kl.Chemie 1964 (1965) 539

Wersuhn,G., Hübner, G. - Der Einfluß von D_2O auf den Ablauf der Zellteilung u.d.Häufigkeit von Teilungsstadien in der Wurzelspitze von Vicia faba
ibid. S. 545

Galonska, H., Hübner, G. - Über den Ablauf von Wuchsstofftests in Schwerem Wasser
ibid. S. 547

Mučka, S., Einhorn, Cabicar - Einfluß des physiol.Inokulumalters auf das Wachstum einer mikrobiellen Kultur in H_2O und 50% D_2O
Z.Naturforschung 20 b (1965) 610

Williams, Morse, Stuart - Produktion von Grünalgen in D_2O
Canad. J.Microbiol. 12 (1966) 1167

Henderson, T.R., Lamonds, D. - Wirkungen v. D_2O auf die Citronensäure- u. Pyruvatcarboxylasebildung durch Asperg.niger
Arch.Biochem.Biophysics 115 (1966) 187

Jung, K., Hübner, G. - Wirkung von Penicillin G auf wachsende Zellen von Esch.coli B in H_2O- u. D_2O-Komplettmedien
Naturwissenschaften 53 (1966) 114

Carp, R.I., Kritchevsky, D. - Influence of Heavy Water on the Multiplication of Adeno and Mengo Virus
Experientia 23 (1967) 786

Henderson, T.R., Dacus, Crespi - Deuteriumisotopen-Wirkungen auf die ß-Galaktosidasebildung durch Esch.coli
Arch.Biochem.Biophys. 120 (1967) 316

Nona, D.A., Blake, M., Katz, J.J. - Effect of Deuterium Oxide on Culturing of Penicillium janczewskii I
J.pharm.Sci. 56 (1967) 1063

Khalil, M.T., Lauffer, M.A. - Polymerization-Depolymerization of Tobacco Mosaic Virus Protein - Effect of D_2O
Biochemistry 6 (1967) 2474

Jung, K. - Mutationsauslösung durch Schweres Wasser bei einem streptomycinabhängigen Stamm von Proteus mirabilis
Z.Allg.Mikrobiologie 8 (1968) 1

Wirkung auf höhere Pflanzen

Mrtek, R.G., Crespi, Blake, Katz, J.J. - Effect of D_2O on the Saprophytic Culture of Claviceps I. Nutritional Factors
J. Pharm.Sci. 54 (1965) 1450

Siegel, B.V., Galston - Biosynthese v. deuterierten Isoperoxydasen in D_2O gewachsener Roggenpflanzen
Proc.Natl.Acad.Sci.US 56 (1966) 1040

Dahlhelm, H. - Der Einfluß von D_2O auf die Atmung und die Bildung von Indolyl-Acetylasparaginsäure bei IES-behandelten Pflanzengeweben
studia biophysica, Berlin 4 (1967) 145

Hübner, G. - Wirkung von Schwerem Wasser bei höheren Pflanzen
studia biophysica, Berlin 4 (1967) 155

Dahlhelm, H., Hübner, G. - D_2O als Inhibitor der auxin-induzierten RNS-Synthese
Naturwiss. 56 (1969) 89

Sil'chenko, V.V. - Action of Heavy Water on meristems of Secale cereale roots
Dokl.Akad.Nauk. SSSR 211 (1973) 963

Bhandarkar, M.K., Bhattacharya, S., Gaur, B.K. - The effect of Deuterium oxide on the Gibberellicacid-induced α-Amylase in Germinating Barley Seeds
Z.Naturforschung 25b (1970) 1066

Wirkung auf Zellen und Gewebekulturen

Lavillaureix, J. - Die Wirkung Schweren Wassers auf die Kernteilung von Zellkulturen
C.R.hebd. Séances Acad.Sci. 252 (1961)622

Rothblat, G.H., Martak, D.S., Kritchevsky, D. - Die Wirkung v. D_2O auf die Lipidkomponente von L 5178 Zellen (Mäuseleukämie)
P.S.E.B.M. 112 (1963) 598

Petrakis, N.L., Davis, M.,Siegel,B.V. - Die Störung der Proliferation und Differenzierung von mononucleären Leukozyten zu Fibroblasten
Nature 200 (1963) 591

Rothblat, G.H., Hartzell, R.W., Kritchevsky, D. - Vergleich der Wirkung von D_2O und Röntgenstrahlung auf die Lipoidzusammensetzung von Gewebekulturzellen
Pure appl. Chem. 8 (1964) 507

Orgel, L. - Adaption of Cells to Deuterium oxide
J.Molec. Biol. 9 (1964) 208

Mao, Ch., Huang,C.H.- Verstärkung des Virustiters von Japanischer B Encephalitis in Hühnerembryonalzellen durch D_2O und mögliche Mechanismen
Sci. sinica 14 (1965) 885 Peking

Henderson, T.R., Dacus, D.M., Henderson, R.F. - Deuterium-Isotopieeffekte bei der Histonsynthese in Erythroblasten von Vögeln
Arch. Biochem.Biophysics 122 (1967) 599

Wirkung auf höhere Organismen und Tiere

Hughes, A.M., Tolbert, B.M., Lonberg-Holm, K., Calvin, M. - The Effect of D_2O on survival of Mice with Ascites Tumor
Biochem. Biophys.Acta 28 (1958) 59

Hughes, A.M., Calvin, M. - Sterilität bei Mäusen durch D_2O
Science 127 (1958) 1445

Hughes, A.M., Bennett, E.L., Calvin, M. - Weitere Untersuchungen über die Sterilität von männlichen Mäusen durch D_2O
Proc. U.S.Natl.Acad.Sci. 45 (1959) 581
Ann.N.Y.Acad.Sci. 84 (1960) 763

Czajka, D.M., Finkel, A.J. - Wirkung von D_2O auf die Fortpflanzungsfähigkeit von Mäusen
Ann.N.Y.Acad.Sci. 84 (1960) 770

Czajka, D.M., Finkel, A.J., Fischer, C.S., Katz, J.J. - Physiological Effects of Deuterium oxide on Dogs
Amer. J.Physiol. 201 (1961) 357

Amarose, A.P., Czajka, D. - Cytophatische Wirkungen von D_2O auf die männliche Keimdrüse der Maus und des Hundes
Exptl. Cell Res. 26 (1962) 43

Tumanjan, V.G., Schnol, S.E. - Über die physiologische und mutagene Wirkung von D_2O auf Drosophila melanogaster
Biofizika 8 (1963) 15

Hughes, A.M., Glass, L.E. - Histological Investigations of the Mechanism of Sterility induced by Deuterium oxide in Mice
Nature 208 (1965) 1119

Marsland, D., Hiramoto, M. - Cell-division: Pressure-induced reversel of the antimeiotic effects of Heavy Water on the oocytes of the starfish Asterias forbesi
J. Cell Physiol. 67 (1966) 13

Zunker, M., McKay, R.H. - Ultrastrukturelle Veränderungen bei Deuterium-Vergiftung
Arch. Pathology 82 (1966) 18

Suter, R.B., Rawson, K.S. - Effect of D_2O on behaviour of mice
Science 160 (1968) 1011

Lehr, E., Wenzel, M., Werner, G. - Zur Biochemie des Gedächtnisses: Einfluß v. Schwerem Wasser auf das Gedächtnis von Fischen
Naturwissenschaften 57 (1970) 521

Houseman, R.A., McDonald, I., Pennie, K. - Measurement of Total Body Water in Living Pigs by Deuterium Oxide Dilution and its Relation to Body Composition Brit. J. Nutr. 30 (1973) 149

Pittendrigh, C.S., Caldarola, P.C., Cosbey, E.S. - Differential Effect of Heavy Water on Temperature-dependent and Temperature-compensated Aspects of the Circadian System of Drosophila pseudoobscura Proc.Natl.Acad.Sci.US 70 (1973) 2037

Lehr, E., Werner,G., Wenzel, M. - Zur Biochemie des Gedächtnisses: II. Besseres Lernen von Fischen in Schwerem Wasser Naturwissenschaften 61 (1974) 399

Weitere physiologische Untersuchungen mit D_2O

Susina, S.V., Hiter, F.D., Siegel, F.P., Blake, M.I. - Effect of Deuterium Oxide on Local Anesthetic Activity of Procaine J.pharm. Sci. 51 (1962) 1166

Levenson, S.M., Crowley, L.V., Geever, E.F., Rosen, H., Berard, C.W. - Some studies of wound healing: Experimental methods, effect of Ascorbic acid and effect of Deuterium oxide J. Trauma 4 (1964) 543

Lindley, B.D., Hoshiko, T., Leb, D.E. - Effects of D_2O and Osmotic Gradients on Potential and Resistance of the Isolated Frog Skin J. Gen. Physiol. 47 (1964) 773

Jenerick, H. - Action current of striated muscle in H.Water Amer. J.Physiol. 207 (1964) 944

Kritchevsky, D. Tepper, S.A. - Oxidation of Cholesterol by Rat Liver Mitochondria: Influence of Deuterium Oxide Experientia 22 (1966) 84

Morton, J.I., Siegel, B.V. - Role of Heavy Water as Solvent in the Antigen Antibody Precipitin Reaction Experientia 22 (1966) 371

Holland, J., Antoni, F. - Effect of Heavy Water on the cell-free protein-synthesizing system Biochem. Biophys.Acta 157 (1968) 663

Sabelli, H.C., Priest, W.C. - Water structure in Anesthetic Action: Time-Dependence D_2O Effects on Nerve Arzneim.Forschung 20 (1970) 80

Ebstein, B.S., Samuel, D. - Respiration of brain slices in heavy water J.Neurochemistry 18 (1971) 1597

Ehrlich, H.P., Bornstein, P. - Microtubules in Transcellular Movement of Procollagen Nature New Biol. 238 (1972) 257

Boettger, M., Wunderlich, V., Schuett, M., Foerster, W., Graffi, A. - Über das Sedimentationsverhalten mitochondrialer DNS in stabilisierenden D_2O-Gradienten Acta biol.Med.Germanica 21 (1968) 587

Einfluß auf biochemische Parameter und Verschiedenes

Thomson, J.F. - Die Fumarase-Aktivität in D_2O
Arch.Biochem. Biophysics 90 (1960) 1

Henderson, T.R., - Differential Inhibition of ß-Galaktosidase Induction and Synthesis by D_2O
Biochem.Biophys.Res.Comm. 9 (1962) 240

Thomson, J.F., Bray, D.A., Bummert, J.J. - Effects of Deuterium Oxide on Malic-DH
Biochem.Pharmacol. 11 (1962) 943

Henderson, T.R. - The use of Deuterium Isotopeeffects for studies of DNA structure and function
J.Arkansas Med.Soc. 59 (1963) 10

Thomson, J.F., Darling, J.J., Bordner, L.F. - Isotope-effects of Deuterium on LDH of Rabbitmuscle
Biochem.Biophys.Acta 85 (1964) 177

Thomson, J.F., Nance, S.L. - Deuterium Isotopeeffects on beef-heart LDH
Biochem.Biophys.Acta 99 (1965) 369

Thomson, J.F., Bush, K.J., Nance, S.L. - Pancreas-Lipase Activity in D_2O
P.S.E.B.M. 122 (1966) 502

Vasilescu, D., Fiancette, C., Mesnard, G. - Étude dielectrique de la denaturation thermique de solutions de DNA dans l'eau lourde
Biochem.Biophys.Acta 129 (1966) 417

Flashner, M., Lukton, A. - The Effect of D_2O on the Activity of α-Amylase
Biochem.Biophys.Acta 146 (1967) 596

Kahn, J., Rittenberg, D. - Stereochemie des durch Succinat-DH katalysierten Succinat-D_2O-Austausches
Biochem.Biophys.Res.Comm. 27 (1967) 484

Chapelle, S., Schoffeniels, E. - De la structure quaternaire de la Deshydrogenase du L-Glutamate
Arch.Int.Physiol.Biochem. 80 (1972) 1

Hüttenrauch, R., Fricke, S. - Use of Isotope Effects for Stabilizing Drugs against Radiation Effects
Pharmazie 28 (1973) 545

Lebenslauf

Am 9.März 1946 wurde ich, als 2.Sohn des Ingenieurs Gerhard E.Biesewig und seiner Ehefrau Alide, geb.Fehlhauer, in Hamburg geboren.

Nach vierjähriger Volksschulzeit besuchte ich das Gymnasium für Jungen in Hamburg-Blankenese und legte dort am 21.2.66 die Reifeprüfung ab.

Meine Praktikantenzeit verbrachte ich in der Alten Apotheke in Hamburg-Rissen vom 1.4.66 bis 31.März 1968.

Am 18.März 1968 bestand ich vor dem Prüfungsausschuß in Hamburg die Pharmazeutische Vorprüfung.

Im Sommersemester 1969 begann ich mit dem Pharmaziestudium an der Freien Universität Berlin. Die Pharmazeutische Prüfung bestand ich am 8.Mai 1972.

Im Juni 1972 begann ich unter Anleitung von Prof.Dr.M.Wenzel mit der vorliegenden Dissertation.